

## ВЪЗМОЖНОСТИ НА АФДТ ЗА ЛЕЧЕНИЕ НА БИОФИЛМ-МЕДИИРАНИ ЗАБОЛЯВАНИЯ В УСТНАТА КУХИНА. ЛЕЧЕБНИ ПРОТОКОЛИ

Мая Дойчинова<sup>1</sup>, Ивета Катрева<sup>2</sup>, Майя Колева<sup>1</sup>, Весела Добрева<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Катедра „Консервативно зъболечение и орална патология“, МУ-Варна,

<sup>2</sup>Катедра „Протетична дентална медицина“, МУ-Варна

## POSSIBLE APPLICATIONS OF APDT FOR THE TREATMENT OF BIOFILM MEDIATED ORAL CAVITY ENTITIES. CLINICAL PROTOCOLS

Maya Doychinova<sup>1</sup>, Iveta Katreva<sup>2</sup>, Mayya Koleva<sup>1</sup>, Vesela Dobreva<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Conservative dentistry and Oral pathology

<sup>2</sup>Department of prosthetic dentistry

### РЕЗЮМЕ

В последните години АФДТ навлиза като безопасна и ефективна алтернатива на конвенционални антибиотици и дезинфектанти за топикалното лечение на инфекциозни заболявания. Устната кухина предлага отлични условия за използването на тази методика, тъй като позволява локално прилагане на фотосенсибилизатор и директно доставяне на подходяща светлина до обгагрените клетки. Образованият при това взаимодействие силно активен синглетен кислород *in situ* упражнява деструктивното си въздействие върху бактериални клетки, протозои и вируси. Ефектът е мигновен, с липса на въздействие върху отдалечени органи и системи. Въвеждането на LED източници вместо лазерни превръща метода в общодостъпен за денталните практики и налага познаването на клиничните протоколи за приложение при лечение на дентинната рана при дълбок кариез, пародонтит и гингивит, инфекция на ендодонта.

**Ключови думи:** фотодинамична терапия, дентални биофилми

### ABSTRACT

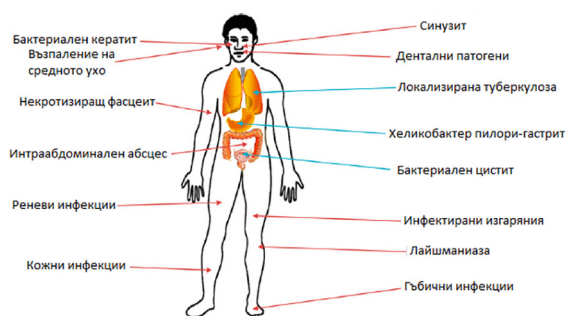
For the last decade the APDT became a safe and effective alternative of the conventional antibiotics and disinfectants for the topical treatment of infection diseases. The oral cavity is an excellent choice for APDT as it allows the local application of photosensitizer and direct irradiation with a suitable wavelength of the dyed cells. The singlet oxygen which is produced *in situ* exercise a direct lethal effect on bacteria, protozoa and viruses. It is fast reaction with no side effects. The introduction of LED light sources instead of laser ones turns the method into an affordable one. Therefore the knowledge of the protocols for the treatment of dental wound in deep caries, parodontitis and gingivitis, as well as endodontic infection, becomes a necessity.

**Keywords:** photodynamic therapy, dental biofilms

## ВЪВЕДЕНИЕ

Антибактериалната фотодинамична терапия се прилага във всички области на медицината, като с предимство са ситуации, при които има възможност за безпрепятствено доставяне на светлина до прицелните обогрени клетки.

На Фиг. 1 са представени възможните области на приложение (2). Сред най-перспективните и достъпни области е и устната кухина с оралните патогенни микроорганизми, участващи в етиологията на социално значими заболявания като зъбен кариес и пародонтит (4,7,9). Освен тези две заболявания на лечение с АФДТ подлежат остри и хронични форми на гингивит и периимплантит (6). Благоприятно се повлиява инфектирането на кореново-каналната система, водеща до усложнения от страна на периодонциума (11,12). Интересен е фактът, че при пациенти, инфектирани с ХИВ, онкоболни на химио- или лъчелерапия, при които има инфектиране с *S.albicans*, третирането с метиленово синьо като фотосенсибилизатор и едновременното прилагане на светлина от червения спектър водят до овладяване на инфекцията. Положителното е, че методът няма тежките странични ефекти на системната противогъбична терапия (13). Протоколите за приложение са лесни, невреемемки и въвеждането им в денталната практика не представлява клинична трудност.



Фиг. 1. Области на приложение на фотодинамичната терапия

## ТЕРМИНОЛОГИЯ

Методът е познат и се среща в научната литература под различни наименования (2):

- Фотодинамична терапия (ФДТ)
- Фотодинамична антибактериална химиотерапия (ФАХТ)
- Антимикробна фотодинамична терапия (АФДТ)
- Фотодинамична дезинфекция (ФДД)
- Фотоактивирана дезинфекция (ФАД)

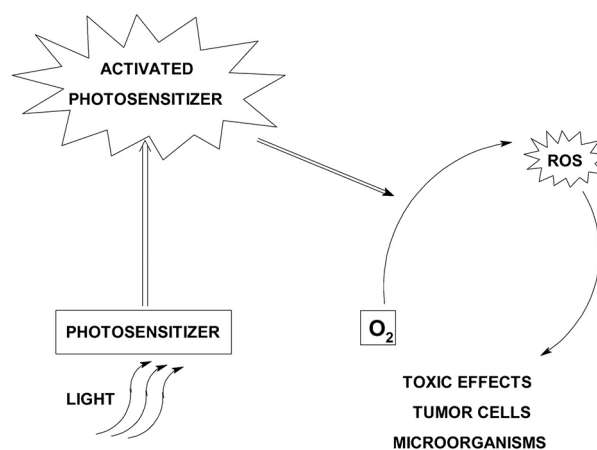
- APDT(aPDT) antimicrobial photodynamic therapy
- PAD - photoactivated disinfection
- LAD - light activated disinfection.

### Механизъм на действие и видове увреждания

Фотосенсибилизаторът се подлага на въздействието на светлина с подходяща дължина на вълната. Химичната структура на багрилото фотосенсибилизатор определя неговия спектър на поглъщане. Когато спектърът на поглъщане съвпадне с дължината на вълната на приложената светлина, възникват условия за осъществяване на фотодинамични реакции.

По време на взаимодействието на тези два параметъра фотосенсибилизаторът преминава от стабилното си релаксирано състояние във възбудено високоенергийно състояние. Времето на съществуване на фотосенсибилизатора в това състояние е изключително кратко и се последва от момент на релаксация (отдаване на енергия). След този момент се инициират два типа реакции. Тип едно е реакция на директно взаимодействие на ФС с биологични структури и фосфолипидни радикали, водещи до генерирането на свободни радикали хидроген пероксид и супреоксид, а тип две е свързана с реакцията на ФС с молекулен кислород, прехвърляне на складираната в неговите двойни връзки енергия на светлината върху молекуления кислород. Това води до неговото преминаване от стабилно триплетно състояние в нестабилно високоенергийно и силно активно синглетно състояние. Класическата диаграма за обяснение на фотодинамичния процес е диаграмата на Яблонски (Фиг. 2) (2,13).

Настъпва оксидативен стрес за подложениите на влияние структури, водещ до тяхното увреждане, най-често несъвместимо със живота на клетката, от която произхождат. Фотодинамич-



Фиг. 2 Схема на фотодинамичния ефект

ните процеси предизвикват увреждане на клетъчни структури, ДНК мутации, унищожаване на бактериите. Нито багрилото, нито светлината поотделно имат такова въздействие.

#### **Характеристики на синглетния кислород**

Краткият полуживот на синглетния кислород: във вода – 4 мсек, в хлороформ – 250 мсек, в етанол – 20 мсек, гарантира прекратяване на реакцията веднага след спиране на въздействието. От друга страна малкото дифузионно разстояние на синглетния кислород ограничава мястото на въздействие - 0.02  $\mu\text{m}$  радиус. Предимствата на тези две характеристики на синглетния кислород са много съществени:

1. Не позволява възникването на резистентност, тъй като няма време за генетична адаптация.
2. Малкият дифузионен потенциал и радиус на движение ограничават мястото на въздействие.
3. Идеален за топикално приложение и не засяга по-далечни органи и системи (2).

#### **Ефекти, странични ефекти**

Ефектът от локалното приложение на АФДТ могат да се систематизират по следния начин:

- унищожаване на бактерии (99.7%);
- унищожаване на бактерии на места, където механичният контрол и почистване са неосъществими;
- разрушава интегритета на биофилма, разстройва каналите, унищожаване на биофилм-живеещите МО;
- осигурява скъсяване на продължителността на лечение (10-30 sec);
- няма описана резистентност, включително при опит за изкуствено предизвикване на такава;
- аплицира се бързо и лесно (2,13);

Изискванията, за да се осъществят описаните ефекти, са две: от една страна задължително фотосенсибилизаторът трябва да е в контакт с микроорганизмите. От друга страна светлината трябва да е във физически достъп с фотосенсибилизатора, за да го активира и да се отдели на място синглетният кислород.

#### **Странични ефекти:**

Ако се налага приложение на фоточувствителното вещество интравенозно, както е необходимо в общата медицина и най-вече за лечение на онкологични заболявания, които също са обект на лечение с метода, е възможно възникването на фототоксичност и фотоалергия (8). При локалното приложение на фотосенсибилизатор страничните действия се ограничават до рядко оцветяване на меки и твърди зъбни тъкани –

преходно. Ако маргиналната връзка на обтурацията е дефектна, също е възможно нейното маркиране с багрило. Оцветяването е временно и се самоограничава (10,13).

#### **Видове светлинни източници**

Използват се лазерни светлинни източници Helium-neon LASER (633 nm), gallium-aluminum-arsenide diode LASER (630-690, 830 или 906 nm) and argon LASER (488-514 nm), както и LED източници. Важни са плътността и мощността освен дължината на вълната. От плътността, времето и разстоянието до облъчвания обект се формира светлинната доза. Светлинната доза дефинира и ефекта (5,10).

Правят се експерименти за въвеждане на нови багрила, например куркума, които са в спектъра на излъчване на традиционните фотополимеризиращи лампи, налични във всеки зъболекарски кабинет (4,9,23). Все още фотосенсибилизатор, който да има спектър на поглъщане, отговарящ на дължина на вълната от 400-440 nm, не се предлага в клинично разрешена форма за употреба.

#### **Видове фотосенсибилизатори**

Оказва се след многобройни експерименти и клинични студия, че багрилата притежават селективно и избирателно натрупване в различни бактериални клетки. В устната кухина оралните патогени се оказват подходящи за толуидиново синьо, клинично прието и въведено като търговски продукти - ФотоСан, син фотосенсибилизатор (14,26); метиленово синьо – тиазидно багрило, от същата група, с по-слаб разделителен коефициент; тетрациклините също са ефективни фотосенсибилизатори.

Ин витро се експериментира с металфоталцианини, куркума, метиленово синьо, еритрозин, роз бенгал. Не са приключили протоколите за клинична безопасност и все още не се предлагат за клинична употреба въпреки добрите резултати ин витро (2,6,10,15) (Фиг. 3) (10).

## **ПРОТОКОЛИ**

### **Пародонтити, периимлантити, гингивити**

При използването на фотодинамична терапия за лечение на пародонталните заболявания се унищожават само пародонтопатогенните бактерии. Това води до редуциране на възпалението и ограничаване на изявиите му: подуване, кръвене, зачервяване и болка. Разрушаването на биофилма пречи на инкорпорирането на патогенни анаеробни бактерии, тъй като те имат нужда от структуриран биофилм.

LAD studies on plaque biofilm in vitro			
Study (year of publication)	Photosensitizer	nm light/LED/laser	Micro organisms
Dobson and Wilson (1992)	TBO, MB, AIS2Pc, HP-HCL	633 laser	Streptococcus sanguinis Porphyromonas gingivalis Fusobacterium nucleatum Actino. actinomycetemcomitans
Wilson et al (1996)	AIS2Pc	660 LED	Streptococcus sanguinis
Haas et al (1997)	TBO	905 LED	Actino. actinomycetemcomitans Porphyromonas gingivalis Prevotella intermedia
Wood et al (1999)	ZnPc	White light	Mixed strains
O'Neill et al (2002)	TBO	633 laser	Mixed strains
Seal et al (2002)	TBO	633 laser	Streptococcus intermedius
Soukos et al ((2003)	pL-Ce6	Red light	Actinomyces naeslundii
Lee et al (2004)	ALA	630 LED	Pseudomonas aeruginosa
Zanin et al (2005)	TBO	633 laser/639 LED	Streptococcus mutans
Metcalf et al (2006)	Erythrosin	White light	Streptococcus mutans
Hope and Wilson (2006)	SnCe6	488 laser, 543 laser	Streptococcus pyrogenes
Wood et al (2006)	Erythrosin, MB, Photofrin	White light	Streptococcus mutans
Williams et al (2006)	TBO	633 LED	Streptococcus intermedius
Zanin et al (2006)	TBO	639 LED	Streptococcus mutans, sanguinis, sobrinus
Soukos et al (2006)	MB	665 LED	Enterococcus faecalis
Donnelly et al (2007)	TBO	635 Paterson lamp	Candida albicans
Garcez et al (2007)	PEI-Ce6	660 LED	Proteus mirabilis Pseudomonas aeruginosa

Фиг. 3. Селективност на фотосенсибилизаторите

Фотодинамичното въздействие и по-специално активността на синглетния кислород не само редуцира броя на пародонтопатогенните, но също и дезактивира важни ензими, които отговарят за прикрепянето на бактериите и нарушава възможността им да разграждат съединителната тъкан на гостоприемника. Нарушава протеолитичната активност на протеазите на *Porphyromonos gingivalis* и разрушава хемаглютинина (Bhatti et al, 2001). Еднакво уязвими са *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *Fusobacterium spp.*

Използва се успешно за лечение на периимплантити и същевременно SEM показва неприкосновеност на титаниевата повърхност паралелно с редуциране на броя на бактериите (18,19,22).

#### Протокол:

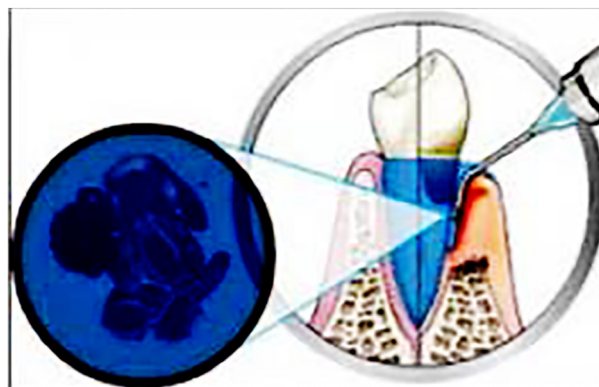
Започва се с традиционно механично почистване и обработка на кореновите повърхности. Следват следните етапи:

1. Фотосенсибилизаторът се аплицира в пародонталните джобове.
2. Изчаква се 1 мин.
3. Дълбоките джобове се осветяват в продължение на 10 сек. с дълъг крайник или според инструкциите на производителя.

4. С помощта на къс и затъпен крайник се осветяват от гингивалната страна още 10 секунди - или според инструкциите.
5. Упражнява се плътен натиск с меките тъкани.

#### Ендодонтска инфекция

Приложението е предимно при инфектирани коренови канали и е допълващо традиционната механична и химична обработка (11,12,17,25,27,28). Налага се от факта, че съществува остатъчна флора, както и биофилм-организиранни колонии от *E. faecalis*. Неправилната и изключително сложна форма на кореново-каналната система, наличието на аксесорни и латерални канали позволяват по време на механичната й



Фиг. 4. Схематично представяне на процеса при лечение на пародонтити



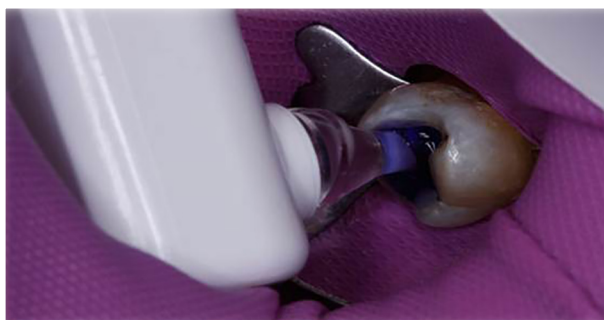
Фиг. 5 Неправилна форма на кореновите канали

обработка достъп до едва 35% от повърхността. Останалите 65% би трябвало да бъдат "достигнати" по време на химичната обработка посредством активирани иригационни разтвори. Точно в тази фаза е и приложението на АФДТ, тъй като редуцира необходимостта от медикаментозна терапия, а съевременно се редуцира остатъчната флора, разрушава се биофилмът по кореновите канали. Това води до бързо повлияване на възпалителните симптоми и съкращава броя на визитите при ендодонтско лечение. Не на последно място терапията е алтернативна при алергични към натриев хипохлорит и хлоркескидин пациенти.

Толуидиновото синьо е доказано безопасен продукт за периапикалните тъкани и е сертифициран за употреба в Европа (14).

**Конкретният протокол е следният за коренов канал:**

1. Механична и химична обработка и подсушаване.
2. Нанася се ФС, с нисък вискозитет, с канюла вътре в КК.
3. Не се въвежда повече от 2/3 от дължината на КК.
4. С малък номер К-пила леко се разнася вътре в канала, да се освободи от въздушни мехури.



Фиг. 6. Приложение на АФДТ за кореново канална дезинфекция

5. Вибриращ светлинен източник, каквито някои производители предлагат, също допринася за отстраняване на въздушни мехурчета.
6. Въвежда се ендонакрайника до усещане на съпротивление.
7. Накрайникът трябва да е висококоничен - това гарантира, че няма да има загуба на енергия и че посредством течността светлината ще достигне и до форамен апикале.
8. 30 до 60 сек на канал.
9. Иригация със стерилен физиологичен разтвор и подсушаване.
10. Всички канали се третират по посочения начин.

**Дълбок кариес**

- При лечение на дълбок кариес стигаме до различен вид дентинна рана. Видовете дентин, при които има нужда от допълнителна сигурност относно тяхното бактериално почистване, са афектиран и третичен. При тях освен високата им пропускливост към пулната тъкан има и достатъчно ниши за развитие на остатъчни микроорганизми. Същевременно традиционните дезинфектанти за почистване на дентинна рана не са препоръчителни поради вероятността от химично или термично увреждане на зъбната пулпа. Синглетният кислород не може да проникне в зъбната пулпа, тъй като има късо дифузионно разстояние, затова обработката на дентинна рана при дълбок кариес, както и при биологично лечение от закрит тип, посредством фотодинамична терапия е безопасна и сигурна алтернатива на традиционната медикаментозна обработка.

**Протокол:**

1. Нанася се ФС в кавитета.
2. Изчаква се 1 минута тъмнинно инкубиране.
3. Осветява се за 10 сек.
4. Отмива се с физиологичен разтвор.
5. Запечатва се.
6. Проследява се по познатите протоколи за лечение на дълбок кариес – биологично лечение на пулпити (18).

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

В заключение може да се обобщи, че за да се осъществи фотодинамичният механизъм на въздействие, бактериите се оцветяват и се превръщат в обагрени мишени, които в следствие се разрушават при осветяване със светлина с подходяща дължина на вълната. Предимствата

на фотодинамичното унищожаване на микроорганизми пред конвенционалната антибиотична терапия са по отношение на двойната селективност, която се изразява при избора на фотосенсибилизатор със селективно натрупване и подбора на областта, която се осветява. Безопасността на метода се дължи на късото дифузионно разстояние на главния активен елемент - синглетния кислород, което в комбинация със селективното натрупване в патогенни клетки прави клетките на гостоприемника защитени. Бързото летално въздействие прави терапията ефективна и към микроорганизмите, организирани в биофилм, и едновременно с това обуславя феномена на липса на бактериална резистентност. На базата на тези предимства следват клиничните ползи от въвеждането на терапията в ежедневната дентална практика: ускорено лечение на биофилм-индуцирани заболявания, намаляване на броя посещения за лечение. Оксидативният стрес, който съзнателно и краткотрайно прилагаме в устната кухина с подходяща апаратура, разстройва и унищожават оралните биофилми. Въвеждането на АФДТ в лечебната дентална практика не представлява клинична трудност при наличните на съвременни апарати и подходящи накрайници. Методиката е част от съвременната тенденция за ограничаване на повсеместната, често ненужна употреба на системни антибиотици с цел ограничаване възникването на свръхрезистентни бактериални щамове.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Alanis AJ. Resistance to antibiotics: Are we in the post-antibiotic era? Arch Med Res. 2005 Nov-Dec; 36(6):697-705.
2. Amalrich X. Ragàs. Singlet Oxygen in Antimicrobial Photodynamic Therapy: Biological effects, Mechanistic Studies and Future Directions. Doctoral thesis, Bracelona, Universitat Ramon LLull, 2001.
3. Angelov I, Mantareva V, Kussovski V, Worle D, Kisov H, Belcheva M, Georgieva T, Dimitrov S. Susceptibility of representative Dental Pathogens to inactivation by the PDT with water-soluble photosensitizers 2011 Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering 7994, art. no. 79941A.
4. Araujo N, Fontana C, Bagnato V, Gerbi M. Photodynamic effects of Curcumin against cariogenic pathogens. Photomed Laser Surg. 2012 Jul; 30(7):393-9.
5. Brancalèon L, Moseley H. Laser and non-laser light sources for photodynamic therapy. Lasers Med Sci 2002; 17:173-86.
6. Dai T, Huang Y, Hamblin M. Photodynamic therapy for localized infections-state of the art. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2009 Sep-Dec; 6(3-4):170-88.
7. Dogandzhiyska V, Gergova R, Dimitrov S, Doychinova M. Antimicrobial activity of photodynamic therapy against microorganisms isolated from deep carious lesions. J of IMAB 2013 Jul-Dec; 19(4):430-434.
8. Epstein JH, Phototoxicity and photoallergy. Semin Cutan Med Surg. 1999 Dec;18(4):274-84.
9. Fekrazad R, Bargrizan M, Sajadi S, Sajadi S. Evaluation of the effect of photoactivated disinfection with Radachlorin(®) against Streptococcus mutans (an in vitro study). Photodiagnosis Photodyn Ther. 2011; 8(3):249-253
10. Feuerstein O. Light therapy: complementary antibacterial treatment of oral biofilm. Adv Dent Res. 2012 Sep;24(2):103-7.
11. Fonseca MB, Júnior PO, Pallota RC, Filho HF, Denardin OV et al. Photodynamic therapy for root canals infected with Enterococcus faecalis. Photomed Laser Surg. 2008 Jun; 26(3):209-13.
12. Foschi F, Fontana CR, Ruggiero K, Riahi R, Vera A, Doukas AG, Pagonis TC, Kent R, Stashenko PP, Soukos NS. Photodynamic inactivation of Enterococcus faecalis in dental root canals in vitro. Lasers Surg Med. 2007 Dec;39(10):782-7.
13. Freire M, Decastro IC, Campos PF, Marques AM, Ferraz EG, Sarmiento VA. Applicability of antimicrobial photodynamic therapy in dentistry. Archs. F Oral Science and research, 2, 2012, No 2.
14. Gambarini G, Grande P. In vitro evaluation of the cytotoxicity of FotoSan™ light-activated disinfection on human fibroblasts. Med Sci Monit. 2011 Feb 25; 17(3): 21-5.
15. Hakimihha N, Khoei F, Bahador A, Fekrazad R. The susceptibility of Streptococcus mutans

- to antibacterial photodynamic therapy: a comparison of two different photosensitizers and light sources. *J Appl Oral Sci.* 2014 Apr;22(2):80-4.
16. Hamblin MR, Hasan T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem Photobiol Sci.* 2004 May; 3(5):436-50.
17. Jori G, Fabris C, Soncin M, Ferro S, Coppellotti O, Dei D, Fantetti L, Chiti G, and Roncucci G. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: Basic principles and perspective applications. *Lasers Surg Med* 38, 2006; 38: 468-481.
18. Konopka K, Goslinski T. Photodynamic therapy in dentistry. *J Dent Res.* 2007 Aug; 86(8):694-707.
19. Maisch T. A new strategy to destroy antibiotic resistant microorganisms: antimicrobial photodynamic treatment. *Mini Rev Med Chem.* 2009 Jul; 9(8):974-83.
20. Mantareva V, Kussovski V, Angelov I, Borisova E, Avramov L, Schnurpfeil G, Wohrle D. Photodynamic activity of water soluble phtalocyanines Zn(II) complexes against pathogenic microorganisms *Bioorg Med Chem.* 2007 Jul 15;15(14):4829-35.
21. Mantareva V, Kussovski V, Angelov I, Wohrle D, Dimitrov R, Popova E, Dimitrov S. Non-aggregated Ga(III)-phtalocyanines: synthesis and photodynamic effect on pathogenic microorganisms planktonic and biofilm cultures. *Photochem Photobiol Sci.* 2011 Jan; 10(1):91-102.
22. Meisel P, Kocher T. Photodynamic therapy for periodontal diseases: state of the art. *J Photochem Photobiol B.* 2005 May; 79(2):159-70.
23. Paulino TP, Ribeiro KF, Thedei Jr G, Tedesco AC, Ciancaglini P. Use of hand held photopolymerizer to photoinactivate *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol.* 2005 Mar; 50(3):353-9
24. Pereira CA, Romerio R, Costa A, Machado A, Junqueira J, Jorge A. Susceptibility of *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, and *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic inactivation: an in vitro study. *Lasers Med Sci.* 2011 May; 26(3):341-8.
25. Siddiqui SH, Awan KH, Javed F. Bactericidal efficacy of photodynamic therapy against *Enterococcus faecalis* in infected root canals: a systematic literature review. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2013 Dec; 10(4):632-43.
26. Soukos NS, Wilson M, Burns T, Speight PM. Photodynamic effects of toluidine blue on human keratinocytes and fibroblasts and *Streptococcus sanguis* evaluated in vitro. *Lasers Surg Med.* 1996; 18:253-9.
27. Souza LC, Brito PR, de Oliveira JC, Alves FR, Moreira EJ et al. Photodynamic therapy with two different photosensitizers as a supplement to instrumentation/irrigation procedures in promoting intracanal reduction of *Enterococcus faecalis*. *J Endod.* 2010 Feb; 36(2):292-6.
28. Taraszkiewicz A, Fila G, Grinholc M, Nakonieczna J. Innovative strategies to overcome biofilm resistance. *BioMed Research Int.*, article ID: 150653, 2013.

**Адрес за кореспонденция:**

д-р Мая Дойчинова  
Катедра по консервативно зъболечение и орална патология  
Факултет по дентална медицина  
Медицински университет  
„Проф. д-р Параскев Стоянов“ - Варна  
e-mail: mayunid@yahoo.com