

# ЕФЕКТ НА ФОТОСАН И МЕТИЛЕНОВО СИНЬО КАТО ФОТОЧУВСТВИТЕЛНИ ВЕЩЕСТВА ВЪРХУ СТРУКТУРИРАНЕТО НА ДЕНТАЛЕН БИОФИЛМ - ИН ВИВО ИЗСЛЕДВАНЕ

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

<sup>1</sup>Катедра по консервативно зъболечение и орална патология

<sup>2</sup>Катедра по протетична дентална медицина

Факултет по дентална медицина, МУ-Варна

## EFFECT OF METHYLEN BLUE AND FOTOSAN® USED AS PHOTOSENSITISERS ON THE STRUCTURING OF ORAL DENTAL BIOFILM-AN I VIVO STUDY

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 dental medicine,

Faculty of Dental Medicine, Medical University of Varna

### РЕЗЮМЕ

Изследването обхваща контингент от кариес-нерезистентни индивиди. Състои се от изключване на оралнохигиенните грижи за определен период от време и въздействие върху избрана група зъби с две различни фоточувствителни вещества. Целта е да се проследи и оцени посредством плак-индекси има ли разлика върху плако-натрупването при третираната и нетретираната група зъби. Резултатите са с малки разлики между двете използвани вещества и показват възможност за потенциално въвеждане на антибактериалната фотодинамична терапия за контрол на структуриране на кариогенния биофилм ин виво.

**Ключови думи:** дентален биофилм, фотосан, метиленово синьо

### ABSTRACT

The following study focuses on a group of caries prone individuals. During the study all the individuals had to restrain of all means of oral hygiene, and the effect of two photosensitizers was evaluated. For this purpose plaque indices were used. The results show minor differences for the used dyes and show a potential area of application of antibacterial photodynamic therapy for control of dental cariogenic biofilm in vivo.

**Keywords:** dental bofilm, fotosan, methylen blue

## УВОД

Зъбният кариес е полиетиологично комплексно заболяване на твърдите зъбни тъкани (ТЗТ), което протича хронично, преминавайки от ранния обратим стадий на некавитирана деминерализирана лезия на зъбния емайл до необратимия стадий на дълбок кариес с директно въздействие върху зъбната пулпа. Заболяването е с характер на пандемия, тъй като засяга индивиди от всички популации и във всички възрастови групи. Късните усложнения на кариеса включват възпаление на зъбната пулпа, периодонтити, екстракции на зъби. Сред факторите с етиологично значение е и денталният кариогенен биофилм, съставен от мутанс стрептококи, лактобацили и не мутанс стрептококи, имащи ацидогенен потенциал. Профилактиката на кариеса включва задължителен контрол върху кариогенния биофилм посредством ежедневна орална хигиена, използване на антимикуробни води за уста. Алтернативни подходи се търсят за оптимизиране ефекта на намаляване на кариогенния биофилм и минимизиране страничните ефекти от употребата на агресивни разтвори за изплакване от типа на хлорхексидиновите. Част от тези алтернативни антибактериални подходи е и светлинно активираното унищожаване на микроорганизми, известно като антибактериална фотодинамична терапия (АФДТ). Проведеното клинично изследване сравнява ефекта, получен от прилагането на Фотосан<sup>®</sup> и метиленово синьо при прекратяване на оралнохигиенните грижи. Ефектът е отчетен с два плак-индекса.

## МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Контингент - пациенти и здрави лица. Изследвани са 35 доброволци на възраст 18-45 години в базата на ФДМ - клинични зали, както и в нашата денталната практика.

Критерии за подбор на доброволци - две групи критерии:

От локален характер:

- Лица от мъжки пол на възраст 18-45 години.
- Кариес нерезистентно съзъбие.
- Незасегнато от пародонтит съзъбие.
- Липса на екстрахираните зъби (екстрахираните мъдречи не са критерий за изключване).
- Лица, незасегнати от емайлова дисплазия.
- Лица с нормален размер на вестибулум орис.

От общ характер:

Медицински некомпрометиран пациенти - нестрадащи от:

- доказани заболявания на ССЗ - артериална хипертония, исхемична болест на сърцето, състояние след мозъчен инсулт, сърдечна декомпенсация, хипертрофия на миокарда, увреждания на сърдечните клапи, бактериален ендокардит, антикоагулантна терапия;
- диабетно болни;
- психично болни;
- лица с доказани алергии и астма;
- чернодробни увреждания и вирусни хепатити.

2. Фоточувствителни багрила

- Метиленово синьо (МС), (сток-разтвор БФР) - крайна концентрация на активното вещество - 145µM/L вещество (Хим. спектър ООД).
- Фотосан (ФС<sup>®</sup>) - медиум вискозитет - CMS Dental APS, Copenhagen Denmark (патентован продукт). Активно вещество толуидиново синьо (ТС)

3. Средства за професионална (клинична) орална хигиена (КОХ)

Спринцовки от 2 мл и канюли. Инструменти, материали и консумативи за орална хигиена - ултразвуков скалер, накрайници за ултразвуков скалер за надвенечен и подвенечен зъбен камък на EMS, кюрети Грейси, апарат за въздушно полиране air-flow, прах за полиране air-flow comfort, чашковидни и конусовидни четки за полиране, фини абразивни интердентални лентички, ненавосъчен конец за зъби. Разтвор 0.5% фуксин за позитивиране на зъбна плака по зъбните повърхности.

4. Светлинен източник - LED лампа, Smart Dent Red, №3494, 630 nm дължина на вълната, с интензитет на изхода на оптичната система, регулируем от 40 до 200 mW/cm<sup>2</sup>. Експериментите са извършени при интензивност 100 mW/cm<sup>2</sup> ± 5%, като челото на световода е на разстояние 1 до 1,5 cm от облъчваната повърхност. При това отстояние на челото на световода от съответната зъбна повърхност петното е с диаметър 2 до 2,5 cm. При времетраене на облъчването от 2-3 мин. светлинните дози са от порядъка на 15-20 J/cm<sup>2</sup> (Фиг. 1).

5. Помощни материали

- Платно за кофердам.
- Изолаторни памучни ролки.
- Пародонтална сонда.
- Аспираторни канюли.

- Очила с оранжев филтър за протекция по време на облъчването.

**Методика на АФДТ ин виво:**

*Първо посещение:* След преглед, целящ подбиране на участниците в изследването по поставените от нас критерии, попълване на амбулаторен картон и подписване на декларация за информирано съгласие, на първото посещение се провежда КОХ. Посредством плак-детектор на фирма Оптика лазер се потвърждава отсъствието на биофилм върху зъбните повърхности.

Контролната група (зъбите от лявата долночелюстна половина - 33, 34, 35, 36, 37) се покрива с платно от кофердам. Платното се използва като светлинна бариера. Третираната група зъби (43, 44, 45, 46, 47) се подсушава и облива с 2 мл разтвор на ФС\*, включително в междузъбните пространства, и със съответно 145 µM/L метиленово синьо във формата на БФР сток-разтвор. (Облъчваната група зъби се изолирана с памучни ролки).

Тъмнинно инкубиране е 1 минута. Експериментите се извършват при интензивност 100 mW/cm<sup>2</sup> ± 5 %, като челото на световода е на разстояние 1 до 1,5 cm от облъчваната зъбна повърхност. При такова отстояние на челото на световода от съответната зъбна повърхност се получава петно с диаметър 2 до 2,5cm. При време на облъчване 2-3 минути дозите са от порядъка на 15-20 J/cm<sup>2</sup>. Третираната група зъби, от 43 до 47, се облъчва вестибуларно и лингвално, с две полета от 2 cm, по две минути на поле. Общо време на облъчване:

- на поле - 2 минути;
- на повърхност (вестибуларна / лингвална) - 4 минути;
- на третирана група зъби - 8 минути.

Пациентът се инструктира да не използва никакви средства за орална хигиена в продължение на 72 часа. За отстраняване на хранителни остатъци му се препоръчва обилно изплакване с вода.

*Второ посещение,* на 24-тия час: Повтарят се описаните етапи на експеримента, без частта, включваща КОХ. Отново се аплицира фотосенсибилизатор върху третираните зъби.

*Трето посещение,* на 48-ия час: Повтарят се описаните етапи на експеримента, без частта, включваща КОХ. За трети път се аплицира фотосенсибилизатор върху третираните зъби.

*Четвърто посещение,* на 72-рия час: Позитивира се зъбната плака на пациента с 0.5% разтвор на фуксин по възприетата методика. Отчита се формирането на биофилм на контролната и третирана група зъби с плак-индекси. В същото посещение след отчитане на индексите опитът завършва с почистване на натрупаната зъбна плака по правилата на провеждане на професионална орална хигиена и инструктаж на пациента за правилна лична орална хигиена, в зависимост от индивидуалните потребности на съзъбието му. Контролиране на състоянието на гингивалните тъкани на 24-тия час след приключване на изследването и на 7-ия ден.

Отчитат се РНР и SL плак-индекси, модифицирани от нас за целите на изследването, на контролната и третираната група зъби. Двама индекса се използват за определяне на количеството зъбна плака.

**РЕЗУЛТАТИ**

Отложената по зъбните повърхности плака на третирана и контролна група зъби беше количествено определена посредством снемането на индексите РНР и SL. Резултатите и статистическите анализи са представени в таблици.

На Табл. 1 са представени обобщени стойности на резултатите от АФДТ върху структурирането ин виво на дентален биофилм.

Примери от клиничното изследване са илюстрирани на Фиг. 1, Фиг. 2, Фиг. 3.

*Табл. 1. Обобщени стойности на резултатите от АФДТ върху структурирането ин виво на дентален биофилм*

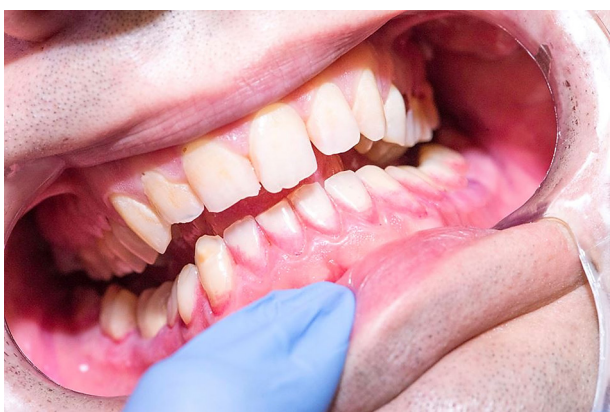
	РНР <sub>мод</sub> - АФДТ	РНР <sub>мод</sub> -контрола	SL - АФДТ	SL - контрола
МС - Стойност	0,7	0,89	1,62	1,77
МС - Оценка <sub>мод</sub>	умерено-изобилно	изобилно	умерено	изобилно
ФС* - Стойност	0,5	0,88	1,45	2,79
ФС* - Оценка	умерено	изобилно	умерено	изобилно



Фиг. 1. Оцветяване с фуксин, контролна група зъби в ляво и третирана в дясно на 72-ия час от изследването - ФС<sup>®</sup>



Фиг. 2. Оцветяване с фуксин, третирана група зъби на 72-ия час от изследването - МС



Фиг. 3. Оцветяване с фуксин, контролна група зъби на 72-ия час от изследването - МС

### ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ ОТ ЧЕТВЪРТА ЗАДАЧА

Клиничният експеримент се провежда в рамките на 72 часа (три денонощия) от спиране на оралнохигиенните грижи, тъй като целта ни е да проследим има ли ефект АФДТ с избрани от нас ФС на базата на предшестващи ин витро изследвания, върху формирането на този ранен биофилм, съставен предимно от *MS* и *Streptococci*

*Species*. Считаме, че ако се повлияе на първичното структуриране на бактериалната плака, то това неминуемо ще доведе до разстройване на структурирането ѝ към по-слабо кариогенна (5).

Статистическата обработка показва сигнификантна разлика в резултатите, получени при групите зъби, получаващи АФДТ, и контролните групи зъби, както за групата, третирана с МС, така и тази, третирана с ФС<sup>®</sup> (активно вещество ТС). Статистически значима разлика се отчита и при определяне количеството образуван биофилм, както с ПИ - SL, така и с модифицирания от нас за целите на експеримента индекс - РНР.

Положителният резултат (по-малко количество образуван биофилм) е по-изразен при групата, получаваща АФДТ с ФС<sup>®</sup>. По-слабият ефект, наблюдаван при използването на МС, вероятно се дължи на следните причини:

- Въпреки че толуидиново синьо и метиленово синьо са фенотиазидни деривати и имат подобни физико-химични качества и хидрофилност, която позволява свободното им преминаване през бактериалната мембрана (2), има разлика в резултатите, които получихме, отразяващи фотодинамичната им активност и ефикасност.
- Отличаваща характеристика между двата фотосенсибилизатора е коефициентът за разделяне Р, който е почти трикратно по-висок за ТС. Това съотношение отразява по-високата възможност на молекулите на ТС да преминават и да се натрупват хидрофобните области на клетъчната мембрана и следователно да изявят по-силен фотобактерициден ефект. Като допълнение, молекулите на ТС имат по-висока способност да димеризират от тези на МС (3)

Фотоинактивацията на *Streptococcus mutans* се дължи най-вероятно увреждане на клетъчната мембрана поради липидна пероксидация (3). Това е и най-възможният механизъм на действие на медираната от ФС<sup>®</sup> (ТС), АФДТ. От друга страна, фотобактерицидното действие на МС е в много малка степен концентрирано върху външната клетъчна мембрана и в значително по-изразена степен, върху увреждане на бактериалната ДНК.

За разлика от ТС, което повишава пропускливостта на клетъчната мембрана, то МС се свързва с бактериалната ДНК, генерира нишковидни скъсвания в структурата и това води до генетични мутации и като краен резултат се осъществява фоторазрушение на бактериалната клетка. Мястото на вътребактериално натрупване и

съответно специфично бактерицидно действие е пряко свързано с инкубационното време преди осветяване. Времето, необходимо на фотосенсибилизаторите, оказващи влияние на ДНК, е по-дълго от това на тези, които увреждат клетъчната мембрана.

По време на клиничното изследване с МС оценката на количеството на формирания биофилм на фотодинамичната група зъби сравнено с контролната група зъби, е умерено към изобилно. Има сигнификантна статистическа разлика и при двата използвани ФС, но по-категоричен е ефектът при използването на ФС<sup>®</sup> - стойност 0,5 за ФС<sup>®</sup> към 0,7 за МС, отчетени с РНР; и 1,45 за ФС<sup>®</sup> към 1,62 за МС, отчетени с SL. Горните попадат в диапазона на стойности, получаващи една и съща оценка (умерено), с изключение на 0,7 за метиленовото синьо с РНР, където една стотна го нарежда в диапазона на следващата оценка (изобилно) (Табл. 1). Вероятна причина може да е действително еднаквото инкубационно време. Взехме решението за еднакво инкубационно време, за да изравним клиничните условия.

Доказано е, че посредством клинична орална хигиена и механично отстраняване на зъбната плака се постига разрушаване на биофилма върху зъбните повърхности и свеждането му до минимум, без обаче да има бактерициден ефект (5). Фактът, че при добра орална хигиена хората заболяват от кариес, би могъл да се обясни с това, че МО остават в предилекционните места по зъбните повърхности, където никога не се отстранява напълно зъбният биофилм. В тези участъци има винаги MS, който участва в патогенезата на началната зъбна деминерализация по вече описаните механизми. От АФДТ очакваме да се инактивират тези МО, натрупани в предилекционните места, и да се редуцира заболяемостта от зъбен кариес.

Провеждането на АФДТ още на първото посещение непосредствено след КОХ цели именно да постигне окончателен бактерициден ефект върху остатъчния биофилм. Следващите 3 процедури в условията на прекратена орална хигиена имат за цел да демонстрират как влияе АФДТ ин виво на структурирането на биофилма. *Streptococcus mutans* се поселва още в този най-ранен етап и ако неговото поселване бъде възпрепятствано, то архитектурата на биофилма също ще претърпи качествени и количествени промени. Резултатите, отчитащи умерено по количество структуриране на биофилм, след прекратяване на орално хигиенните грижи за 72 часа, оценено със съответните индекси за групата, получа-

ваща АФДТ, сравнено с контролната, неполучаваща фотодинамична терапия, подкрепят тези разсъждения. Искахме да проучим до каква степен метиленово синьо (145µM) може да бъде конкуренция и да се използва за целите на АФДТ в условията на устната кухина по същия начин, по който наложилият се вече в практика търговски продукт ФС<sup>®</sup> с активно вещество -толуидиново синьо. Резултатите са обещаващи и статистически достоверна е разликата между групата, третирана с МС, и контролната група зъби. Факт е обаче, че при зъбите, получаващи ФС<sup>®</sup> оценката на количеството формиран биофилм, според РНР е умерено, а при групата, получаваща МС, е изобилно, макар и да попада в диапазона на тази оценка само заради една стотна.

*Wood et al* провеждат ин витро фотодинамичен експеримент, но върху ин виво структуриран 7-дневен биофилм при естествени условия. Биофилмът се натрупва върху специална пластинка, прикрепена към емайла на зъб в устата на пациент. След тъмнинна инкубация с Zn-фталоцианин и проведена АФДТ с LED светлинен източник на трансмисионен електронен микроскоп са наблюдавани следните ефекти:

- изтъняване и загуба на маса на биофилма;
- редуциране на размера на микропространствата вътре в биофилма;
- значително увреждане на бактериите, изразяващо се във вакуализация на цитоплазмата и мембранно увреждане (6).

Първото публикувано изследване на ефекта на АФДТ върху структурирането на биофилм ин виво е от края на 2014 г. (1). Авторите Ichinose-Tsuno A et al използват ТС в концентрация 150µM, тъмнинното инкубиране 10 sec и изследват ефекта на фотодинамична дезинфекция върху 11 доброволци – дентални лекари, които прекратяват оралнохигиенни грижи за 4 денонощия. Използваната светлина е LED генерирана. Натрупаното количество биофилм се изчислява със софтуер, който обработва заснети изображения на позитивиран с фуксин биофилм. Обект на експресното микробиологично изследване е *S. oralis* и посредством бърз тест за определяне на бактериални клетки докладват статистическа редукция на CFU/мл в биофилма след АФДТ. В осъщественото от нас изследване оценката на количеството структуриран биофилм се извършва съобразно регистрираните стойности на два плак-индекса. Данните от японския експеримент бяха публикувани, след като нашият клиничен експеримент беше приключил, и макар че целта на двата експеримента е много близка, в нашия

проследяваме ефекта и на друг фотосенсибилизатор (МС) и отчитаме резултатите по оригинален начин.

Считаме, че резултатите от двата експеримента потвърждават възможността за контрол върху ранните етапи на структуриране на биофилма посредством АФДТ, проведена с LED и ТС.

При проведеното за първи път от нас изследване по описаната оригинална методика доказахме загуба на маса на биофилма чрез количественото му измерване с плак-индекси. Базираме се на данни, публикувани през 1987 година от Schaecken et al, който доказва връзката между количеството *Streptococcus mutans* в денталния биофилм, отчетена с CFU/ml, и оценката, получена по плак-индекса на Силнес и Льо. Увеличаването на количеството CFU/ml *Streptococcus mutans* с 1 лог в плаката се отразява с една единица промяна в стойността, отчетена с плак-индекса на Силнес и Льо (4).

Проведеното сравнително изследване обективизира данните, получени и при използването на друг индекс, оценяващ плаконатрупване при АФДТ и модифициран от нас за целите на клиничното ни изследване - РНР. Статистическа обработка показва, че независимо с кой от двата индекса е работено при оценката на плакообразуването, няма разлика в оценката.

### ИЗВОДИ

- В резултат на проведената АФДТ се възпрепятства структурирането на денталния биофилм в ранните етапи от спиране на оралнохигиенните грижи.
- Статистически значим резултат се наблюдава и при двете използвани от нас багрила за целите на клиничното изследване. По-съществен е ефектът при прилагането на ФС<sup>®</sup>, сравнено с ефекта при МС.
- Редуцирането на MS в резултат на проведената АФДТ води до качествени изменения в биофилма. Налице е пряка зависимост между логаритмичното увеличение на броя *S. mutans* в биофилма и стойностите на SL и РНР.
- АФДТ с ФС<sup>®</sup> и МС е подходящ допълващ метод за контрол на кариогенния биофилм и контрол на началните деминерализационни некавитиранни лезии на емайла.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Ichinose-Tsuno A, Aoki A, Takeuchi Y, Kirikae T et al. Antimicrobial photodynamic therapy suppresses dental plaque formation in healthy adults: a randomized controlled clinical trial. BMC Oral Health. 2014 Dec; 14:152.
2. Kleinberg I. A mixed-bacteria ecological approach to understanding the role of the oral bacteria in dental caries causation: an alternative to *Streptococcus mutans* and the specific-plaque hypothesis. Crit Rev Oral Biol Med. 2002; 13(2):108-25.
3. Rolim J, de-Melo M, Guedes S, Albuquerque-Filho F, de Souza J, Nogueira N, Zanin I, Rodrigues L. The antimicrobial activity of photodynamic therapy against *Streptococcus mutans* using different photosensitizers. J Photochem Photobiol B 2012 Jan 5; 106:40-6.
4. Schaecken MJ, Creugers T, Van der Hoeven JS. Relationship between dental plaque indices and bacteria in dental plaque and those in saliva. J Dent Res. 1987 Sep; 66(9):1499-502.
5. Wilkins ME. Bacterial plaque and other soft depositions in Clinical Practice of the Dental hygienist. Executive editor Sh.Zinner, 7th Ed.,Williams &Wilkins, 1994. 260-267.
6. Wood S, Nattress B, Kirkham J, Shore R, Brookes S, Griffiths J, Robinson C. An in vitro study of the use of photodynamic therapy for the treatment of natural oral plaque biofilms formed in vivo. J Photochem Photobiol B. 1999 May;50(1):1-7.

#### 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