

# EFECTUL *IN VITRO* AL TERAPIEI FOTODINAMICE ASUPRA BIOFILMULUI DENTAR

## Rezumat

Scopul prezentului studiu a constituit evaluarea în condiții *in vitro* al efectului aplicării terapiei fotodinamice asupra *tulpinilor bacteriene cariogene din biofilmul dentar*. În calitate de agenți de fotosensibilizare au fost testate soluțiile: albastru metilen 0,5% și extractul antocianic 5% (pH 8,0–9,0), eritrozină 0,5% și a extractului antocianic 5% (pH 4,5–5,0). În calitate de catalizator a fost utilizată suspensia de dioxid de titan 1%. S-a comparat efectul bactericid al aplicării substanțelor de fotosensibilizare concomitent cu catalizatorul. Iradierea a fost efectuată cu dispozitive LED 625–635 nm și 420–480 nm cu expoziția 30 și 60 secunde. Datele obținute în rezultatul studiului efectuat au demonstrat eficiența înaltă a aplicării în calitate de substanță fotosensibilizantă a extractului antocianic în PDT care asigură distrugerea totală a tulpinilor microorganismelor cariogene.

**Cuvinte cheie:** *terapia fotodinamică, substanțe fotosensibilizante, biofilmul dentar.*

## Summary

### **IN VITRO EFFECT OF PHOTODYNAMIC THERAPY ON DENTAL BIOFILM**

The goal of the present study was to evaluate the *in vitro* conditions of the effect obtained when applying photodynamic therapy on cariogenic bacterial strains in dental biofilm. The following solutions were tested as photosensitivity agents: methylene blue 0.5% and 5% anthocyanin extract (pH 8.0 to 9.0), erythrosine 0.5% and 5% anthocyanin extract (pH 4.5–5.0). As a catalyst, we used titanium dioxide suspension of 1%. There was conducted a comparison of the bactericidal effect of applying photosensitivity substances together with the catalyst. The irradiation was performed with LED devices of 625–635 nm and 420–480 nm, for 30 and 60 seconds. The data obtained from this study demonstrate the high efficiency of applying anthocyanin extract as a photosensitizing substance in photodynamic therapy, which ensures a total destruction of the strains of cariogenic microorganisms.

**Key words:** *photodynamic therapy, photosensitizing substances, dental biofilm.*

## Introducere

Caria dentară rămâne până în prezent una din cele mai frecvente afecțiuni stomatologice. De-a lungul secolului trecut, studiului cariei dentare a fost consacrată o varietate impunătoare de lucrări științifice fundamentale și aplicate. În același timp, în ciuda nivelului tot mai performant de cunoștințe și echipamente implementate în asistența stomatologică, prevalența cariei dentare la populația țării noastre este înaltă, fără tendințe aparente de reducere a valorilor ei [4, 9, 10].

În ciuda unor progrese în soluționarea problemei tratamentului și prevenirii cariei dentare, rămâne relevantă elaborarea de noi metode și procedee terapeutice și implementare pentru reducerea nivelului de morbiditate. În decursul ultimilor decenii în medicină se aplică cu succes terapia fotodinamică (Photodynamic therapy PDT) care se bazează pe reacții fotochimice declanșate de interacțiunea unei substanțe fotosensibile și lumină cu anumită lungime de undă având ca rezultat formarea de oxigen atomic și radicali liberi care induc distrugerea bacteriilor, virusurilor și a țesuturilor țintă (celule tumorale sau țesuturi proliferative). Fotosensibilizarea celulelor poate fi indusă prin administrarea exogenă de molecule fotoactive cu avantajul că celulele modificate, anormale au capacitatea mult mai mare

Aurelia Spinei,  
*d.m., conf. univ.*

Iurie Spinei,  
*d.m., conf. univ.*

Catedra Chirurgie OMF  
Pediatrică, Pedodontie  
și Ortodontie, USMF  
„Nicolae Testemițanu“

de absorbție a substanței administrate spre deosebire de celulele sănătoase (10:1) [6]. După expunerea la lumină, substanțele fotosensibilizante decad din starea de stabilitate eliberând oxigen atomic (cel mai important agent citotoxic în PDT) și radicali liberi, care determină distrugerea celulară ca o consecință a alterării membranelor mitocondriale și citoplasmice, precum și perturbarea funcțiilor [7]. Zona efectului citotoxic al oxigenului singlet nu depășește 0,02 mcm, iar durata de acțiune în sistemele biologice este mai mică de 0,04 ms.

Terapia fotodinamică antimicrobiană este alternativa antibioticoterapiei și constă în distrugerea oxidativă selectivă a florei patogene prin intermediul interacțiunii combinate a colorantului — fotosensibilizatorului și a luminii. Efectul controlabil al luminii și iradierii cu laser poate fi aplicat în corectarea numărului unor specii concrete de bacterii în compoziția microflorei în condiții de disbioză, deoarece administrarea preparatelor antimicrobiene în asemenea condiții este inadmisibilă [3, 11].

Acțiunea bactericidă și bacteriostatică a PDT asupra agenților patogeni se produce prin intermediul generării oxigenului singlet și radicalilor peroxizi de substanțele fotosensibile exo- și endogene cu o demarare ulterioară a unui șir de reacții fotochimice. A fost demonstrat că efectul PDT cu aplicarea albastrului de metilen și iradierea cu lumină (400 — 700 nm) în doza 10 Dj/cm<sup>2</sup> provoacă inactivarea *in vitro* a ARN-ului Q $\beta$  bacteriofagului prin intermediul atașării de proteine plasmatică [6]. Cercetările efectuate în condiții *in vitro* au constatat reducerea creșterii culturilor bacteriene care a fost provocată nu doar direct de efectul PDT, dar și de stresul oxidativ secundar PDT. Capacitatea celulei bacteriene de a supraviețui în condiții *in vitro* după exercitarea efectului stresului oxidativ este în funcție de activitatea superoxid dismutazei bacteriene sau de cantitatea și activitatea proteinelor de șoc termic, care în condițiile stresului oxidativ produc 2 tipuri de proteine de șoc termic HSP-70 și HSP-90 [1, 2, 10].

Așadar, reacția fotodinamică este inițiată de acțiunea dozelor adecvate de energie luminoasă asupra substanțelor fotosensibilizante în prezența oxigenului în țesut, efectul fotodinamic distructiv are un caracter localizat, iar acțiunea bactericidă este limitată de zona acțiunii iradierii. Terapia fotodinamică a maladiilor infecțioase prezintă un proces de interacționare a formelor active de oxigen și a radicalilor toxici cu factorii antistres ai bacteriilor, iar efectul ei poate fi diferit, în funcție de intensitatea generării formelor active de oxigen, activității proteinelor antistres, enzimelor antioxidante bacteriene și mulți alți factori.

Terapia fotodinamică este aplicată tot mai frecvent în tratamentul afecțiunilor stomatologice: tratamentul infecțiilor bacteriene, virale și fungice, a lichenuiului plan, în tratamentul cancerului bucal, precum și diagnosticul fotodinamic al transformărilor maligne al leziunilor cavității orale. Datorită faptului că reprezintă o nouă abordare terapeutică în managementul

biofilmelor orale [2, 8], PDT va avea o aplicabilitate și mai largă în tratamentul și prevenirea celor mai frecvente afecțiuni ale cavității orale — afecțiunilor parodontiului, a cariei dentare și complicațiilor ei.

**Scopul** prezentului studiu a constituit în evaluarea în condiții *in vitro* al efectului aplicării terapiei fotodinamice asupra *tulpinilor bacteriene cariogene din biofilmul dentar*.

### **Materiale și metode**

Cercetările *in vitro* au fost efectuate în laboratorul de diagnostic „Micromed”, Chișinău. Au fost prelevate probele de biofilm de la 90 copii cu grad înalt de activitate a procesului carios și capacitate cariogenă sporită a plăcii bacteriene. Materialul a fost colectat până la dejun și igienizarea cavității orale. Cavitatea orală a fost irigată minuțios cu apă distilată sterilă. Prelevarea probelor s-a realizat cu un instrument steril de pe suprafețele jugale ale dinților 1.6, 2.6, linguale 3.6, 4.6 și vestibulare 1.1, 3.1. În cazul dentiției temporare probele au fost preluate de pe suprafețele jugale ale dinților 5.5, 6.5, linguale 7.5, 8.5 și vestibulare 5.1, 7.1. În cazul lipsei dinților indicați, probele au fost prelevate de la dinții vecini. Materialul colectat a fost plasat într-un mediu special și transportat în decurs de 1 oră în laborator. A fost apreciat numărul total de microorganisme. Identificarea bacteriilor din grupul *Streptococcus viridans*: *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus gordonii* ș.a. a fost efectuată cu utilizarea cartelei GPI (pentru coci Gram pozitivi) a sistemului automat Vitek2. Din culturile crescute s-au preparat suspensii după tehnologii standarde. Frotiurile au fost preparate prin etalarea produsului examinat pe o lamă curată și perfect degresată, astfel încât germeii să formeze un strat subțire și uniform. Frotiurile uscate și fixate la flacăra au fost acoperite cu soluțiile cercetate, astfel ca cantitatea de pigment să fie identică pentru toate seriile de experiențe. După aceea ele au fost spălate cu apă și lăsate să se usuce.

Pentru determinarea perioadei de timp necesare pentru a lega în mod eficient compoziția agentului de fotosensibilizare cu celulele microbiene a fost apreciat gradul de colorare a bacteriilor de următorii pigmenți: albastru metilen 0,5%, extractul antocianic 5% (pH 8,0-9,0) și extractul antocianic 5% (pH 4,5-5,0), soluție eritrozină 0,5%. În calitate de catalizator a fost utilizată suspensia de dioxid de titan 1%. S-a comparat efectul aplicării concomitente a pigmentilor și a catalizatorului: albastru metilen 0,5% + suspensia de dioxid de titan 1% și extractul antocianic 5% (pH 8,0-9,0) + suspensia de dioxid de titan 1%, soluție eritrozină 0,5% + suspensia de dioxid de titan 1% și extractul antocianic 5% (pH 4,5-5,0) + suspensia de dioxid de titan 1% (tabel 1). La examinarea microscopică cu obiectivul cu imersie s-a apreciat gradul de colorare a celulelor bacteriene și au fost acordate punctele de la 0 până la 5.

**Tab.1.** Modelul experimental de apreciere a gradului de colorare a microorganismelor

Agentul studiat	Dura- ta min	Gradul de colorare a mi- croorganismelor									
		1	Culturi pure								
			2	3	4	5	6	7			
1. Control	—	Flora nativă din biofilmul dentar	<i>Streptococcus salivarius</i>	<i>Streptococcus mitis</i>	<i>Streptococcus sanguinis</i>	<i>Streptococcus mutans</i>	<i>Streptococcus sobrinus</i>	<i>Streptococcus gordonii</i>			
2. Sol. albastru metilen 0,5%	10								15	20	
Extract antocianic 5% (pH 8,0-9,0)	10								15	20	
	15								20		
	20										
4. Suspensie dioxid de titan 1%	10										
	15										
	20										
5. Extract antocianic 5% (pH 4,5-5,0)	10										
	15										
	20										
6. Soluție eritrozină 0,5%	15										
	20										
7. Extract antocianic 5% (pH 8,0-9,0) + suspensie dioxid de titan 1%	10										
	15										
	20										
8. Extract antocianic 5% (pH 4,5-5,0) + suspensie dioxid de titan 1,0%	10										
	15										
	20										

Însămânțările s-au efectuat pe plăcile Petri cu medii de cultură din geloză — sânge. Cu ajutorul tamponelor de recoltare a fost aplicat câte 0,1 ml de suspensie cu concentrația  $10^6$  microorganisme în  $1 \text{ cm}^3$  de soluție. Pe fiecare placă Petri au fost delimitate 5-7 sectoare în care cu o micropipetă au fost aplicate câte o picătură de soluție cercetată, astfel ca cantitatea de pigment să fie identică pentru toate seriile de experimente, iar pentru comparație au fost lăsate sectoare netratate (grupul martor). În conformitate cu obiectivele de cercetare propuse a fost elaborat modelul experimental expus în tabelul 2.

În prima serie de experiențe în calitate de substanțe de fotosensibilizare au fost testate soluțiile: albastru metilen 0,5% și extractul antocianic 5% (pH 8,0-9,0), în calitate de catalizator a fost utilizată suspensia de dioxid de titan 1%. S-a comparat efectul bactericid al aplicării substanțelor de fotosensibilizare concomitent cu catalizatorul: albastru metilen 0,5% + suspensia de dioxid de titan 1% și extractul antocianic 5% (pH 8,0-9,0) + suspensia de dioxid de titan 1%. Iradierea a fost efectuată cu dispozitivul FotoSan 630 LAD pen (CMS Dental, Denmark) 625-635 nm cu expoziția 30 și 60 secunde (Fig.1). Iradierea optică aplicată cu lungimea de undă menționată posedă caracteristici spectrale care determină un maxim de absorbție de către fotosensibilizatori (pigmenților de culoare albastră, violetă) și fotocatalizator și o densitate de putere suficientă pentru activarea compoziției.

**Tab.2.** Modelul experimental de iradiere optică a culturilor microbiene în condiții in vitro

n/o	Agentul studiat	Tipul iradi- erii	Du- rata iradi- erii, s	Diametrul zonei de reducere a creșterii mi- croorganismelor (mm)						
				1	Culturi pure					
					2	3	4	5	6	7
1.	Soluție albastru metilen 0,5%	LED 625-635 nm	30	Flora nativă din biofilmul dentar	<i>Streptococcus salivarius</i>	<i>Streptococcus mitis</i>	<i>Streptococcus sanguinis</i>	<i>Streptococcus mutans</i>	<i>Streptococcus sobrinus</i>	<i>Streptococcus gordonii</i>
			60							
	Extract antocianic 5% (pH 8,0-9,0)		60							
			30							
	3. Suspensie dioxid de titan 1,0%		60							
			30							
	4. Soluție albastru metilen 1% + Suspensie dioxid de titan 1%		60							
			30							
	5. Extract antocianic 5% (pH 8,0-9,0) + Suspensie dioxid de titan 1%		60							
			30							
	6. Control (iradiere)		60							
			30							
	7. Control (pigment)		0							
			0							
2.	Soluție eritrozină 0,5%	LED 420-480 nm	60	Flora nativă din biofilmul dentar	<i>Streptococcus salivarius</i>	<i>Streptococcus mitis</i>	<i>Streptococcus sanguinis</i>	<i>Streptococcus mutans</i>	<i>Streptococcus sobrinus</i>	<i>Streptococcus gordonii</i>
			30							
	2. Extract antocianic 5% (pH 4,5-5,0)		60							
			30							
	3. Suspensie dioxid de titan 1%		60							
			30							
	4. Soluție eritrozină 0,5% + Suspensie dioxid de titan 1%		60							
			30							
	5. Extract antocianic 5% (pH 4,5-5,0) + Suspensie dioxid de titan 1%		60							
			30							
	6. Control (iradiere)		60							
			30							
	7. Control (pigment)		60							
			30							



**Fig.1.** Iradiere cu FotoSan 630 LAD pen.

**Tab.3.** Rezultatele identificării streptococilor cu aplicarea cardului de teste ID-GPCVITEK 2 (bioMérieux)

Nr. id. a testului	Testul	Substanța de identificare	mg	S. Salivarius	S. Mitis	S. Sanguinis	S. Suis	S. Mutans	Str. Sobrinus	Str. gordonii
2	AMY	D-Amigdaline	0,1875	-	-	-	-	-	-	+
4	PIPLC	Phosphatidylinositol phospholipase C	0,015	-	-	-	-	-	-	-
5	dXYL	D-xylose	0,3	-	-	-	-	-	-	-
8	ADH1	Arginine dihydrolase 1	0,111	-	-	(-)+	+	-	-	+
9	BGAL	$\beta$ -galactosidase	0,036	-	+	-	+	+	+	-
11	AGLU	$\alpha$ -glucosidase	0,036	+	+	-	+	+	-	-
13	APPA	Alanine-phenylalanine-proline arylamidase	0,0384	+	+	+	+	+	+	+
14	CDEX	$\alpha$ -cyclodextrin	0,3	-	-	-	-	-	-	-
15	AspA	L-aspartate arylamidase	0,024	-	-	+	+	-	-	+
16	BGAR	$\beta$ -galactopyranosidase	0,00204	+	+	+	+	+	+	+
17	AMAN	$\alpha$ -mannosidase	0,036	-	-	-	-	-	-	-
19	PHOS	Phosphatase	0,0504	(+)	-	-	-	-	-	+
20	LeuA	Leucine arylamidase	0,0204	+	+	+	+	+	+	+
23	ProA	L-proline arylamidase	0,0204	-	-	-	-	-	-	+
24	BGURr	$\beta$ -glucuronidase	0,0018	-	-	-	-	+	+	-
25	AGAL	$\alpha$ -galactosidase	0,034	+	+	+	+	+	-	+
26	PyrA	L-pyrrolidonyl-arylamidase	0,0216	-	-	-	-	-	-	-
27	BGUR	$\beta$ -glucuronidase	0,0378	-	-	-	-	+	-	-
28	AlaA	Alanine arylamidase	0,0216	+	+	+	+	+	+	+
29	TyrA	Tyrosine arylamidase	0,0276	+	+	+	+	+	+	+
30	dSOR	D-sorbitol	0,1875	-	-	-	+	+	+	-
31	URE	Urease	0,15	-	-	-	-	-	-	-
32	POLYB	Polymyxin B resistance	0,00093	+	+	+	+	+	+	+
37	dGAL	D-galactose	0,3	+	+	+	+	+	+	+
38	dRIB	D-ribose	0,3	-	-	-	-	-	-	-
39	ILATk	L-lactate alcalinization	0,15	-	-	-	-	-	-	-
42	LAC	Lactose	0,96	+	+	+	+	+	+	+
44	NAG	N-acetyl-D-glucosamine	0,3	+	+	+	+	+	+	+
45	dMAL	D-maltose	0,3	+	+	+	+	+	+	+
46	BACI	Bacitracin resistance	0,0006	-	-	-	-	-	-	-
47	NOVO	Novobiocin resistance	0,000075	+	+	+	+	+	+	+
50	NC6.5	6.5% NaCl	1,68	-	-	-	-	-	-	-
52	dMAN	D-mannitol D-Mannitol	0,1875	-	+	-	+	+	+	-
53	dMNE	D-mannose D-Mannoz	0,3	+	+	+	+	+	+	+
54	MBdG	$\beta$ -methyl-D-glucopyranoside	0,3	+	-	-	+	-	-	+
56	PUL	Pullulan	0,3	+	+	-	+	+	+	-
57	dRAF	D-raffinose	0,3	+	+	+	-	+	+	+
58	O129R	O/129 resistance	0,0084	-	-	-	-	-	-	-
59	SAL	Salicin	0,3	+	+	+	+	+	-	+
60	SAC	Sucrose	0,3	+	+	+	+	+	+	+
62	dTRE	D-trehalose	0,3	+	+	+	+	+	+	+
63	ADH2s	Arginine dihydrolase 2	0,27	-	-+	+	+	-	-	-
64	OPTO	Optochin resistance	0,000388	+	+	+	+	+	+	+

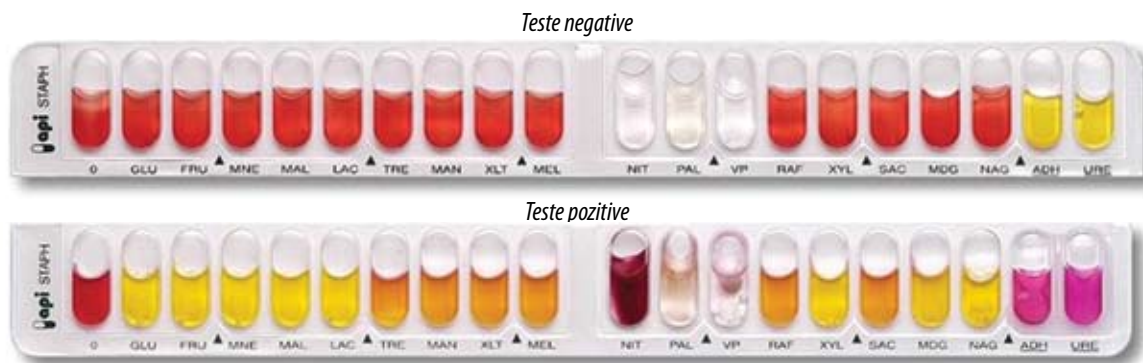


Fig.2. Teste biochimice pentru identificarea streptococilor cu aplicarea cardului ID-GPC VITEK 2 (bioMérieux).

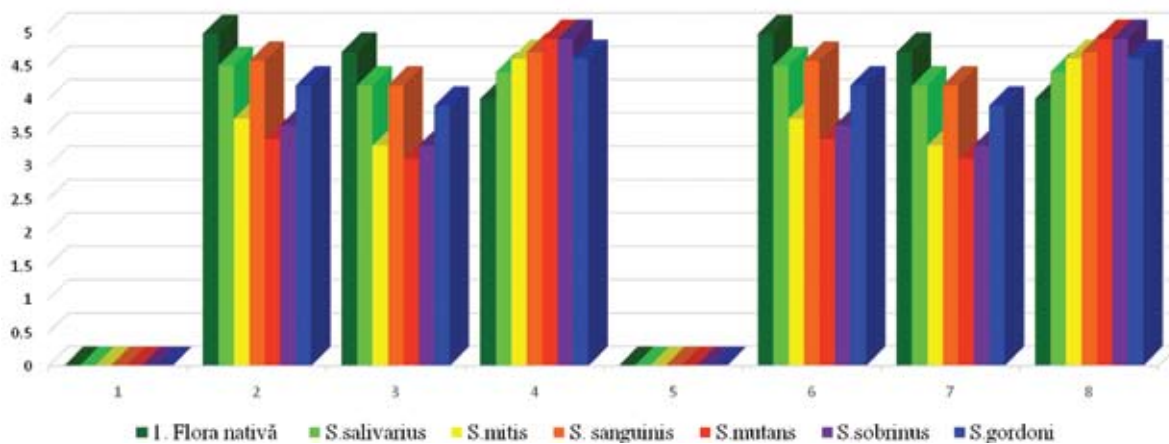


Fig.3. Rezultatele determinării gradului de colorare a bacteriilor de pigmenții studiați:

- |                                       |                                       |  |
|---------------------------------------|---------------------------------------|--|
| 1. Control                            | 4. Extract antocianic 5% (pH 4,5-5,0) | 7. Extract antocianic 5% (pH 8,0-9,0) +<br>Suspensie dioxid de titan 1%  |
| 2. Sol. albastru metilen 0,5%         | 5. Suspensie dioxid de titan 1%       | 8. Extract antocianic 5% (pH 4,5-5,0) +<br>Suspensie dioxid de titan 1%. |
| 3. Extract antocianic 5% (pH 8,0-9,0) | 6. Soluție eritrozină 0,5%            |  |

În a doua serie de experiențe a fost testat efectul aplicării soluției eritrozină 0,5% și a extractului antocianic 5% (pH 4,5-5,0). În calitate de catalizator a fost utilizată suspensia de dioxid de titan 1%. S-a comparat efectul bactericid al aplicării substanțelor de fotosensibilizare concomitent cu catalizatorul: soluția eritrozină 0,5% + suspensia de dioxid de titan 1% și extractul antocianic 5% (pH 4,5-5,0) + suspensia de dioxid de titan 1%. Iradierea a fost efectuată cu dispozitivul WOODPECKER LED (420-480 nm) cu expoziția 30 și 60 secunde. Iradierea optică cu lungimea de undă aplicată corespunde absorbției maxime a fotosensibilizatorului (pigmenților de culoare roșie) și a fotocatalizatorului și o densitate de putere suficientă pentru activarea compoziției.

După iradierea sectoarelor cercetate plăcile Petri au fost incubate 24 ore în termostat la temperatura de 37°C. Contabilizările au fost efectuate la microscopul optic cu mărirea x100. Studiul dat a fost aprobat de Comitetul de Etică a cercetării a USMF „Nicolae Testemițanu”.

### Rezultate

Identificate bacteriilor din probele de biofilm dentar prelevate de la copiii cu gradul înalt de activitate

carioasă a fost efectuată în baza proprietăților morfologice, tinctoriale, culturale și biochimice cu utilizarea cartelei GPI pentru identificarea cocilor Gram pozitivi (fig.1) a sistemului automat Vitek2, rezultatele fiind prezentate în tabelul 3.

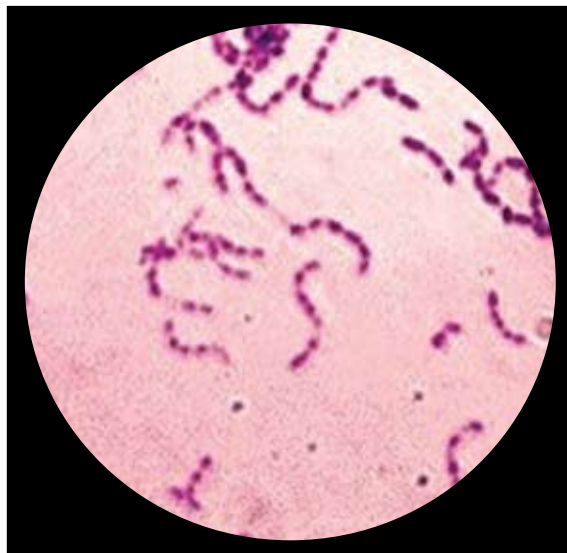
Pentru determinarea perioadei de timp optime pentru a lega în mod eficient compoziția agentului de fotosensibilizare cu celulele microbiene a fost apreciat gradul de colorare a bacteriilor la interacțiunea cu pigmenții testați în decurs de: 10, 15 și 20 min. Colorația maximă a bacteriilor obținute din flora nativă a biofilmului dentar a fost stabilită în cazul aplicării soluției albastru metilen 0,5% și soluției eritrozină 0,5% într-o perioadă minimă de timp (10 min). Însă, acești coloranți au o afinitate redusă pentru tulpinile cariogene. O afinitate maximă pentru tulpinile *Streptococcus mutans* a fost stabilită după aplicarea extractului antocianic timp de 20 min (fig.3-5).

Efectul bactericid al aplicării substanțelor de fotosensibilizare și iradierii ulterioare cu LED 625-635 și 420-480 nm a fost apreciat prin măsurarea zonelor de reducere totală a creșterii microorganismelor în decurs de 24 ore pe plăcile Petri. Prezența zonelor de anihilare a fost observată în toate grupurile de cercetare, comparativ cu grupul martor. Efectul bacteri-

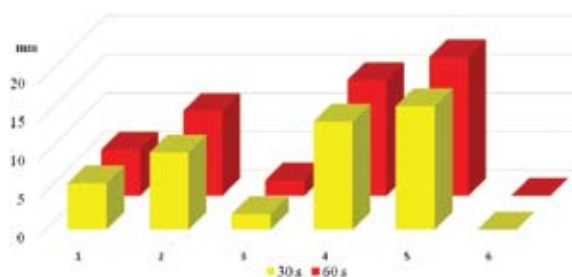




**Fig. 4.** Cultură pură Streptococcus mutans, colorare cu soluție albastru metilen 0,5%, x 800.

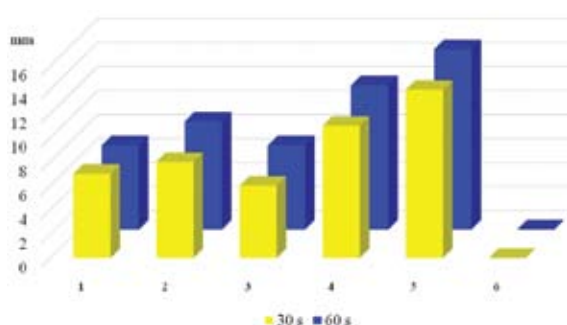


**Fig. 5.** Cultură pură Streptococcus mutans, colorare cu extract antocianic 5% (pH 8,0-9,0), x 800.



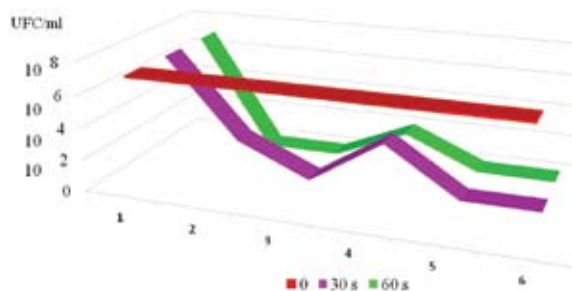
**Fig. 6.** Diametrul zonelor de anihilare a bacteriilor pe plăcile Petri în rezultatul iradierii cu LED 625-635 nm:

1. Soluție albastru metilen 0,5%
2. Extractul antocianic 5% (pH 8,0-9,0)
3. Suspensie dioxid de titan 1%
4. Soluție albastru metilen 0,5%+ suspensie dioxid de titan 1%
5. Extractul antocianic 5% (pH 8,0-9,0) + suspensie dioxid de titan 1%
6. Control.



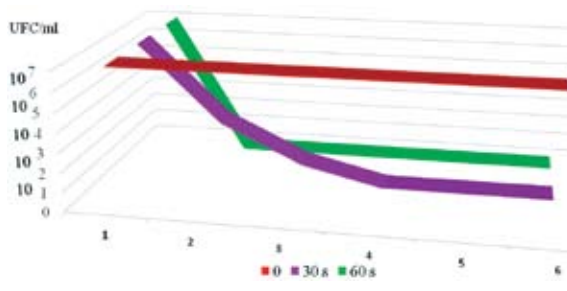
**Fig. 7.** Diametrul zonelor de anihilare a bacteriilor pe plăcile Petri în rezultatul iradierii cu LED 420-480 nm:

1. Soluție eritrozină 0,5 %
2. Extractul antocianic 5%(pH 4,5-5,0)
3. Suspensie dioxid de titan 1,0%
4. Soluție eritrozină 0,5% + suspensie dioxid de titan 1%
5. Extractul antocianic 5% (pH 4,5-5,0) + suspensie dioxid de titan 1%
6. Control.



**Fig.8.** Reducerea numărului de microorganisme în rezultatul iradierii cu LED 625-635 nm:

1. Control
2. Sol. albastru metilen 0,5%
3. Suspensie dioxid de titan 1%
4. Extractul antocianic 5% (pH 8,0-9,0)
5. Soluție albastru metilen 0,5%+ suspensie dioxid de titan 1%
6. Extractul antocianic 5% (pH 8,0-9,0) + suspensie dioxid de titan 1%.



**Fig. 9.** Reducerea numărului de microorganisme în rezultatul iradierii cu LED 420-480 nm:

1. Control
2. Soluție eritrozină 0,5 %
3. Suspensie dioxid de titan 1,0%
4. Extractul antocianic 5% (pH 4,5-5,0)
5. Soluție eritrozină 0,5% + suspensie dioxid de titan 1%
6. Extractul antocianic 5% (pH 4,5-5,0) + suspensie dioxid de titan 1%.

cid a crescut considerabil la aplicarea concomitentă a pigmentilor cu catalizatorul (loturile 4 și 5, fig. 6, 7). Efectuarea PDT cu aplicarea în calitate de soluție fotosensibilizantă a extractului antocianic 5% (pH 8,0-9,0) s-a dovedit a fi de 1,8 ori mai eficientă, comparativ cu utilizarea soluției albastru metilen 0,5% (p<0,001), iar a extractului antocianic 5% (pH 4,5-5,0) — de 1,29 ori mai eficientă comparativ cu utilizarea soluției eritrozină 0,5% (p<0,005).

Analiza bacteriologică ne-a permis să constatăm sensibilitatea microorganismelor la iradierea LED 625-635 nm și aplicarea tuturor pigmentilor studiați, efectul bactericid majorându-se proporțional cu mărirea duratei de iradiere de la 30 la 60 secunde (fig.8). Aplicarea soluției albastru metilen 0,5% (grupul 2) contribuie la reducerea numărului de unități formatoare de colonii/ml (UFC/ml), însă sensibilitatea tulpinilor *Streptococcus mutans* este redusă considerabil. După aplicarea PDT cu utilizarea extractului antocianic 5% (pH 8,0-9,0) în calitate de substanță de fotosensibilizare (grupul 4) are loc nu numai reducerea numărului total de microorganisme în 1 cm<sup>3</sup> de soluție, dar și se produce anihilarea tuturor tulpinilor din grupul *Streptococcus viridans*, fapt care confirmă efectul bactericid asupra tulpinilor cariogene, depășind de 3,5 ori rezultatele obținute în grupul 1 (p<0,001). Aplicarea combinată a soluției albastru metilen 0,5% sau a extractului antocianic 5% (pH 8,0-9,0) și a catalizatorului (grupurile 5 și 6) s-au dovedit a fi mai eficiente în reducerea numărului UFC/ml și a activității streptococilor cariogeni, efectul maxim fiind constat în grupul 6 (aplicarea extractului antocianic 5% (pH 8,0-9,0) concomitent cu suspensia de dioxid de titan 1%) (p<0,005).

Iradierea optică LED 420-480 nm după aplicarea pigmentilor studiați și a catalizatorului a provocat un efect bactericid, care s-a majorat proporțional cu mărirea duratei de iradiere de la 30 la 60 secunde (fig. 9). Aplicarea soluției eritrozină 0,5 % (grupul 2) contribuie la reducerea numărului total UFC/ml. Deși exercită un efect bactericid asupra tulpinilor *Streptococcus salivarius* și *Streptococcus sanguinis*, sensibilitatea *Streptococcus mutans* este mai redusă. După aplicarea PDT cu utilizarea extractului antocianic 5% (pH 4,5-5,0) în calitate de substanță de fotosensibilizare (grupul 4 fig. 8) are loc nu numai reducerea numărului total de microorganisme în 1cm<sup>3</sup> de soluție, dar și se produce anihilarea tuturor tulpinilor din grupul *Streptococcus viridans*, fapt care confirmă efectul bactericid asupra tulpinilor cariogene, care depășește de 2,33 ori rezultatele obținute în grupul 1 (p<0,005). Aplicarea combinată a soluției eritrozină 0,5 % sau extractului antocianic 5% (pH 4,5-5,0) și a catalizatorului (grupurile 5 și 6) s-au dovedit a fi mai eficiente în reducerea numărului UFC/ml și a activității streptococilor cariogeni, efectul maxim fiind constat în grupul 6 (aplicarea extractului antocianic (pH 4,5-5,0) concomitent cu suspensia de dioxid de titan 1,0%) (p<0,005).

## Discuții

Publicații cu privire la aplicarea terapiei fotodinamice în tratamentul cariilor dentare sunt foarte rare și nu sunt abordate pe bază de dovezi. Majoritatea lucrărilor consacrate evaluării efectului PDT asupra biofilmului dentar sunt semnate de E.Tucina și coautori. Experiențele efectuate în condiții *in vitro* de autoare în 2008 au demonstrat că iradierea optică cu o anumită lungime de undă și densitate de putere poate provoca reducerea sau majorarea numărului de microorganisme, modificarea vitalității și morfologiei lor, precum și a proprietăților culturale și tinctoriale ale bacteriilor din componența florei normale ale cavității orale. Modificările numărului relativ al populațiilor bacteriene provocate de influența diferitelor tipuri de iradiții optice a fost constatată pentru toate microorganismele studiate, iar natura acestor schimbări este în mare măsură determinată de particularitățile individuale ale speciei sau tulpinilor de microorganisme [10].

Susceptibilitatea microorganismelor la acțiunea unui tip anumit de iradiere optică este determinată în mare măsură de prezența în celulele lor a unor molecule specifice — a fotosensibilizatorilor endogeni, în particular, a porfirinelor. Absorbția maximă a acestor molecule este în intervalul 400-420 nm, pikurile de absorbție mai puțin pronunțată au fost apreciate pentru lungimile de undă de 550-650 nm (Papageorgiou et al., 2000). Prin urmare, celulele microbiene care conțin aceste substanțe vor fi expuse la acțiunea diferitor tipuri de radiații cu spectrul albastru și roșu. Activitatea fotosensibilizantă a porfirinelor este punctul de reper al PDT îndreptate împotriva agenților patogeni a afecțiunilor cronice a cavității orale. Celulele bacteriilor patogene și oportuniste, datorită utilizării hemoglobinei, au un conținut mai mare de porfirine. În celulele din flora normală cantitatea acestor molecule este mult mai redusă, astfel încât acestea sunt mai puțin sensibile la acțiunea luminii albastre [6, 7].

Rezistența bacteriilor la iradierea optică este asigurată de sistemele de protecție care reduc moleculele de oxigen singlet. Eliminarea formelor active de oxigen în celulele microbiene este determinată de activitatea complexelor enzimatiche: catalaza, peroxidaza, superoxidodismutaza. Modificările în funcționarea sau absența acestor componente determină susceptibilitatea celulelor bacteriene la interacțiunea fotodinamică.

Rezultatele cercetărilor obținute în prezenta lucrare sunt comparabile cu datele raportate de Soukos et al, 1998, Papageorgiou et al., 2000, Hamblin, Hasan, 2004 și Tucina E., 2008.

Aplicarea extractului antocianic în calitate de substanță fotosensibilizantă a fost efectuată pentru prima dată. Antocianii (din greacă *Anthos*= floare și *kianos* = albastru) sunt cei mai importanți pigmenti ai plantelor vasculare, nu sunt toxici și sunt ușor încorporabili în medii apoase ceea ce îi face utili pe post de coloranți naturali hidrosolubili. Acești pigmenti sunt utilizați larg în industria alimentară în calitate de coloranți. În funcție de nivelul pH-ului soluțiile de antociani au o culoare diferită. Astfel, soluțiile cu pH-ul bazic au cu-

loarea albastră sau violetă, iar soluțiile cu pH-ul acid au culoarea roșie. Actualmente se întreprind studii privind efectul antocianilor în tratamentele împotriva cancerului, efectul benefic în nutriția umană și activitatea sa biologică în prevenirea bolilor sistemului nervos, cardiovascular și a diabetului zaharat [5].

Eficiența înaltă a PDT aplicată în condiții *in vitro* a fost asigurată de condițiile optime de aplicare:

- iradierea optică cu lungimea de undă 625-635 nm corespunde absorbției maxime a extractului antocianic cu pH-ul bazic (culoarea albastră sau violetă);
- iradierea optică cu lungimea de undă 420-480 nm corespunde absorbției maxime a extractului antocianic cu pH-ul acid (culoarea roșie);
- iradierea optică s-a efectuat cu o densitate de putere suficientă pentru activarea fotosensibilizatorilor și a compoziției fotosensibilizator + catalizator.
- interacțiunea pigmentilor cu celulele bacteriene cu durata suficientă pentru pătrunderea colorantului în interiorul celulelor bacteriene, astfel asigurând un efect bactericid maxim survenit după iradierea optică cu o lungime de undă corespunzătoare;
- aplicarea combinată a fotosensibilizatorului și a catalizatorului (suspensia de nanoparticule de dioxid de titan) asigură majorarea efectului bactericid a PDT asupra tulpinelor cariogene din biofilmul dentar.

Așadar, PDT este o metodă de tratament care oferă numeroase avantaje: este o tehnică non-invazivă, fără sângerare, exclude necesitatea aplicării anesteziei locale, poate fi aplicată în condiții de ambulator cu efecte adverse minime, poate fi repetată, neavând toxicitate cumulativă și timp de vindecare scurt.

Spre deosebire de alte metode care necesită tratamente pentru perioade mai îndelungate de timp și provoacă unele efecte secundare, în terapia fotodinamică durata tratamentului este mult mai redusă. Este important de menționat faptul că în timpul terapiei fotodinamice sunt afectate numai celulele sensibilizate (în care s-au acumulat derivații porfirinici) și nu este afectat țesutul înconjurător.

Extractul antocianic nu provoacă iritarea mucoasei cavității orale, nu provoacă reacții alergice de tip lent sau imediat. Eficiența metodei nu este influențată de sensibilitatea microorganismelor la preparatele antibacteriene, sunt distruse inclusiv și tulpinile microbiene antibioticorezistente și bacteriile persistente în biofilme. Eliminarea bacteriilor are loc foarte rapid, în câteva minute. Terapia fotodinamică are un spectru

larg de acțiune asupra tuturor agenților patogeni microbieni, efectul antibacterian nu se reduce în timp, în cazul aplicării ședințelor repetate. Acțiunea bactericidă are un caracter local, nu exercită efect nociv asupra florei saprofite a întregului organism.

## Concluzii

Datele obținute în studiul efectuat în condiții *in vitro* a demonstrat că metoda de terapie fotodinamică cu aplicarea în calitate de substanță fotosensibilizantă a extractului antocianic asigură distrugerea totală a microorganismelor cariogene — *Streptococcus Mutans*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus sobrinus* ș.a.

Rezultatele obținute justifică necesitatea cercetărilor ulterioare în condiții *in vivo* și clinice cu privire la utilizarea extractului antocianic în calitate de substanță fotosensibilizantă în PDT.

Aplicarea PDT oferă noi oportunități în elaborarea metodelor eficiente de prevenire a cariei dentare.

## Bibliografie

1. Jones HJ, Vernon DI, Brown SB. Photodynamic therapy effect of m-THPC (Foscan) in vivo: correlation with pharmacokinetics. *Br J Cancer*, 2003; 89 (2):398-404.
2. Konopka K., Goslinski T. Photodynamic Therapy in Dentistry. *Journal of Dental Research*, 2007; 86(8):694-707.
3. Minnock, A., D. I. Vernon, J. Schofield, J. Griffiths, J. H. Parish, and S. B. Brown. Mechanism of uptake of a cationic water-soluble pyridinium zinc phthalocyanine across the outer membrane of *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2000; 44; 5: 22-7.
4. Parsek, M. R., and C. Fuqua. Biofilms: emerging themes and challenges in studies of surface-associated microbial life. *Journal of Bacteriology*, 2004; 186:4427-40.
5. Zorița M., Sconța. Extracția, purificarea și testarea *in vitro* a fracțiilor bogate în antociani obținute din *Aronia Melanocarpa* și *Vaccinium Sp.* Rezumatul tezei de doctorat. Cluj-Napoca, 2012.
6. Wainwright, M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 1998, 42:13-28.
7. Wolfsen H. et al. Photodynamic therapy and biomedical lasers. Ed.: P. Spinelli. *M/Dal Fante dc Marchellini*. Amsterdam, 1992:281-285.
8. Xie, H., G. S. Cook, J. W. Costerton, G. Bruce, T. M. Rose, and R. J. Lamont. Intergeneric communication in dental plaque biofilms. *Journal of Bacteriology*, 2000; 182:7067-9.
9. Леус, П.А. Микробный биофильм на зубах. În: Физиологическая роль и патогенное значение. — М.: Издательский дом „СТBOOK“. 2008. 88 с.
10. Тучина, Е.С., Тучин В.В., Альтшулер Г.Б. Фотодинамическое воздействие красного (625 нм) и инфракрасного (805 нм) излучения на бактерии обработанные фотосенсибилизаторами. *Известия Саратовского университета*, 2008, Т.8, с. 21-26.
11. Яковлев С.В. În: Инфекции и антимикробная терапия, 2001, Т. 3, № 3, с. 6-7.

Data prezentării: 30.07.2013.

Recenzent: Ion Lupan