

ARTICOL DE SINTEZĂ

REVIEW ARTICLE

## Influența terapiei fotodinamice antimicrobiene asupra biofilmului cavității orale: sinteză de literatură

**Aurelia Spinei<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup>Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, Chișinău, Republica Moldova

### Autor corespondent:

Aurelia Spinei, dr. șt. med., conf. univ.  
Catedra de chirurgie oro-maxilo-facială pediatrică, pedodonție și ortodonție  
Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”  
bd. Ștefan cel Mare și Sfânt, 165, Chișinău, MD-2004, Republica Moldova  
e-mail: aurelia.spinei@usmf.md

## Influence of antimicrobial photodynamic therapy upon oral biofilm: a review

**Aurelia Spinei<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup>„Nicolae Testemițanu” State University of Medicine and Pharmacy, Chisinau, Republic of Moldova

### Corresponding author:

Aurelia Spinei, PhD, assoc. prof.  
Chair of Pediatric Oro-Maxillo-Facial Surgery, Pedodontics and Orthodontics  
“Nicolae Testemițanu” State University of Medicine and Pharmacy  
Ave. Ștefan cel Mare și Sfânt, 165, Chisinau, MD-2004, Republic of Moldova  
e-mail: aurelia.spinei@usmf.md

### Ce nu este cunoscut, deocamdată, la subiectul abordat

Nu sunt, deocamdată, clarificate avantajele aplicării terapiei fotodinamice antimicrobiene în tratamentul afecțiunilor cavității orale provocate de biofilme, comparativ cu aplicarea terapiei antibacteriene convenționale.

### Ipoteza de cercetare

Identificarea avantajelor aplicării terapiei fotodinamice antimicrobiene în tratamentul afecțiunilor cavității orale, provocate de biofilme, comparativ cu aplicarea terapiei antibacteriene convenționale, în baza revistei de literatură.

### Noutatea adusă literaturii științifice din domeniu

Sunt prezentate informații sintetizate, actualizate, despre terapia fotodinamică antimicrobiană, fotosensibilizatori, precum și descrise posibilele avantaje ale metodei date de tratament, comparativ cu antibioterapia tradițională a afecțiunilor cavității orale, provocate de biofilme.

### Rezumat

**Introducere.** Afecțiunile cavității orale la copii și tineri în Republica Moldova au o prevalență de la 76,07% la 87,81%, iar la adulți acest indicator depășește 90%, conferind, astfel, acestor maladii dimensiuni sociale, soldate cu un impact economic important. Biofilmul oral are un rol determinant în apariția afecțiunilor stomatologice și este cauza principală a eșecului tratamentului acestora. Rezistența microorganismelor din biofilme la tratamentul antimicrobian și efectele lui adverse frecvente, impulsionază elaborarea unor terapii antibacte-

### What is not known yet, about the topic

In numerous scientific publications on topics covered, the advantages of applying antimicrobial photodynamic therapy in treatment of diseases of the oral cavity caused by biofilms in relation to application of antibacterial therapy are not clearly highlighted.

### Research hypothesis

Based on literature data analysis, in this article we tried to highlight the advantages of antimicrobial photodynamic therapy application in the treatment of diseases of the oral cavity caused by biofilms in relation to the application of antibacterial therapy.

### Article's added novelty on this scientific topic

Synthesis article of the latest literature data on: mechanism of action, effects and benefits of antimicrobial photodynamic therapy application, and photosensitizers. Also, possible advantages of photodynamic therapy vs. conventional antibiotherapy of oral cavity diseases, are presented.

### Abstract

**Introduction.** Diseases of the oral cavity in children and young people in the Republic of Moldova have a prevalence of 76.07% to 87.81%, while in adults this indicator exceeds 90%, thus rendering to these diseases social dimensions with important economic costs. Oral biofilm plays a decisive role in the occurrence of dental diseases and it is the main cause of treatment failure. Resistance of the biofilm microorganisms to antimicrobial treatment and its frequent side effects has driven the development of alternative antibacterial therapies, to

riene alternative, la care, bacteriile nu vor putea să dezvolte rezistență. Aplicațiile tehnologiilor laser deschid o direcție de perspectivă în tratamentul afecțiunilor cavității orale – terapia fotodinamică antimicrobiană. În această lucrare ne-am propus, în baza analizei datelor de literatură, să sistematizăm avantajele aplicării terapiei fotodinamice antimicrobiene în tratamentul afecțiunilor cavității orale, provocate de biofilme, comparativ cu aplicarea terapiei antibacteriene convenționale. Scopul lucrării a constituit analiza sistematizată a literaturii referitoare la efectul terapiei fotodinamice antimicrobiene asupra biofilmului cavității orale.

**Material și metode.** Pentru realizarea obiectivului trasat, în motorul de căutare al bazei de date online PubMed a fost efectuată căutarea publicațiilor științifice după cuvintele-cheie: „*terapie fotodinamică*”, „*terapie fotodinamică antimicrobiană*”, „*biofilm oral și placă bacteriană dentară*”. Din aceste articole, a fost culeasă și prelucrată informația ce ține de acțiunea terapiei fotodinamice antimicrobiene asupra biofilmului oral. Datele obținute au fost, ulterior, sistematizate și analizate.

**Rezultate.** Au fost găsite 1680 de articole care abordează tematica terapiei fotodinamice antimicrobiene. În bibliografia finală, au fost incluse 147 de surse, necesare pentru formularea ideilor textului dat. Efectul terapiei fotodinamice antimicrobiene se datorează reacției fotodinamice, declanșate de interacțiunea unei substanțe fotosensibile și lumina cu o anumită lungime de undă, având ca rezultat formarea speciilor reactive ale oxigenului, iar efectul fotodinamic distructiv are un caracter localizat, cu acțiune bactericidă, care este limitată de zona acțiunii iradierii laser.

**Concluzii.** Terapia fotodinamică poate deveni o alternativă eficientă și progresistă a metodelor antibacteriene tradiționale de tratament. Rezultatele cercetărilor experimentale și clinice demonstrează o eficiență înaltă a aplicării terapiei fotodinamice antimicrobiene în tratamentul afecțiunilor stomatologice.

**Cuvinte cheie:** terapie fotodinamică antimicrobiană, biofilm oral, placă dentară.

## Introducere

Microorganismele joacă un rol important, iar în unele cazuri – determinant în apariția și dezvoltarea afecțiunilor cavității orale. În ultimii ani, un șir de studii au demonstrat că microorganismele sunt capabile să formeze asociații de conviețuire, numite biofilme. Conform conceptului actual, biofilmul reprezintă o unitate biologică activă, un ecosistem specializat, ce oferă vitalitatea și conservarea tipurilor sale constitutive de microorganisme, precum și creșterea populației lor generale [1-3].

Microorganismele din biofilm, fără a-și schimba sensibilitatea lor individuală, supraviețuiesc la acțiunea preparatelor antibacteriene, prezintă proprietăți complexe și paradoxale, cele mai importante fiind rezistența față de agresiunea microorganismelor concurente și la factorii externi nocivi [4].

Din cauza rezistenței microorganismelor din biofilme la

which bacteria are not able to develop resistance. Laser technology applications open up a promising direction for treatment of disorders of the oral cavity – antimicrobial photodynamic therapy. In this article, based on literature data analysis, we have highlighted the advantages of application of antimicrobial photodynamic therapy in the treatment of diseases of the oral cavity caused by biofilms in relation to the application of antibacterial therapy. The objective of the article was to perform a systematized literature analysis and synthesis of the antimicrobial photodynamic therapy effect on oral biofilm.

**Material and methods.** To achieve the given objective, search of scientific publications in online database of PubMed search engine was performed by keywords: “*photodynamic therapy*”, “*photodynamic antimicrobial therapy*”, “*oral biofilm*” and “*dental plaque*”. Information concerning the action of antimicrobial photodynamic therapy on oral biofilm was collected from these articles and processed. The data obtained were then collated and analyzed.

**Results.** As a result of information processing in PubMed database according to the search criteria, there were found 1680 articles on antimicrobial photodynamic therapy. The final bibliography includes 147 sources necessary to formulate the ideas of the given text. The effect of antimicrobial photodynamic therapy is due to photodynamic reaction initiated by interaction of photosensitive substance and light with a certain wavelength, resulting in the formation of reactive oxygen species. The photodynamic destructive effect is localized, while bactericidal action is limited by the action of laser irradiation.

**Conclusions.** Photodynamic therapy can become an effective and progressive alternative to traditional antibacterial treatment methods. The results of experimental and clinical researches allow us to state the possibility and high efficiency of antimicrobial photodynamic therapy application in the treatment of dental diseases.

**Keywords:** photodynamic therapy, photodynamic antimicrobial therapy, oral biofilm, dental plaque.

## Introduction

Microorganisms play an important role, and in some cases bacteria is a determinant value in the emergence and development of diseases of the oral cavity. In recent years, a number of studies have demonstrated that microorganisms are capable of forming cohabitation associations, called biofilms. According to the current concept, a biofilm is an active biological unit, a specialized ecosystem that provides vitality and conservation of its constituent types of microorganisms as well as increase of their general population [1-3].

Biofilm microorganisms, without changing their individual susceptibility, survive under the action of antibacterial medication, exhibit complex and paradoxical properties, the most important being the resistance to aggression of competing microorganisms and harmful external factors [4].

Due to the microorganism resistance to antimicrobial treatment, it is often necessary to administer the treatment

tratamentul antimicrobian, deseori apare necesitatea administrării tratamentului pe o perioadă îndelungată de timp, fapt care poate provoca reacții alergice de tip lent sau imediat, iar în unele cazuri nefro-, hepato-, neurotoxicitate și, în rezultat, toxicitate sistemică [5-10]. Astfel, răspândirea multirezistenței bacteriene la antibiotice poate conduce la sfârșitul „epocii antibioticelor”, care a durat aproximativ 50 de ani [11].

În scopul depășirii efectelor adverse ale tratamentului antimicrobian, la debutul secolului XX, Paul Ehrlich a elaborat conceptul „glontelui de aur”, care, conform autorului, reprezintă un agent antibacterian transportat exact în focarul infecțios și care acționează doar asupra agentului microbial patogen, fiind, totodată, inofensiv pentru celulele organismului gazdă [12]. La etapa actuală, se întreprind cercetări în scopul elaborării terapiei antibacteriene alternative, față de care bacteriile nu vor putea să dezvolte rezistență [7]. Exemple de astfel de terapii relativ noi sunt administrarea bacteriofagilor [13, 14] și aplicarea terapiei fotodinamice antimicrobiene [15, 16]. Terapia fotodinamică, TFD (l. engl. *photodynamic therapy*, PDT) se bazează pe reacții fotochimice, declanșate de interacțiunea unei substanțe fotosensibile, numită fotosensibilizator (FS), în l. engl. *photosensitizer* (PS) și lumina cu o anumită lungime de undă, având ca rezultat formarea speciilor reactive ale oxigenului (SRO) (l. engl. *reactive oxygen species*, ROS) [19-24].

De menționat, că frecvența afecțiunilor cavității orale la copii și tineri în Republica Moldova variază de la 76,07% la 87,81%, iar la adulți acest indicator depășește 90%, conferind, astfel, acestor maladii dimensiuni sociale cu importante repercusiuni economice [17]. Acest fapt impulsionează elaborarea și aplicarea unor tehnologii moderne de tratament și profilaxie în scopul reducerii prevalenței și incidenței afecțiunilor și îmbunătățirea calității vieții populației. Luând în considerație faptul, că factorul microbial are un rol primordial și esențial în apariția și evoluția afecțiunilor stomatologice, actualitatea cercetării de aplicare a terapiei fotodinamice în tratamentul și prevenirea lor este indiscutabilă. Însă, nu sunt, deocamdată, clarificate avantajele aplicării terapiei fotodinamice antimicrobiene în tratamentul afecțiunilor cavității orale provocate de biofilme, comparativ cu aplicarea terapiei antibacteriene convenționale.

În această ordine de idei, scopul lucrării a constituit analiza sistematizată a literaturii referitoare la efectul terapiei fotodinamice antimicrobiene asupra biofilmului cavității orale, comparativ cu tratamentele antibacteriene convenționale.

### Material și metode

Pentru realizarea obiectivului trasat, în motorul de căutare al bazei de date online PubMed al serviciului Bibliotecii Naționale de Medicină a Institutului Național de Sănătate al Statelor Unite (l. engl. *US National Library of Medicine, National Institute of Health*), a fost efectuată căutarea publicațiilor științifice după cuvintele-cheie: „*photodynamic therapy*”, „*antimicrobial photodynamic therapy*”, „*dentistry*”, „*biofilms*”, „*oral biofilm*”, „*dental plaque*” [18].

După examinarea titlurilor articolelor găsite, au fost selectate doar lucrările care, eventual, ar putea include relații ale concepțiilor actuale vizând acțiunea terapiei fotodinamice

for a long period of time, which can cause delayed or immediate allergic reactions, and in some cases nephro-, hepato-, neurotoxicity and ultimately systemic toxicity [5-10]. Thus, emergence of pathogenic bacteria resistance to antibiotics may cause the end of a long period, which lasted for more than 50 years, called “antibiotic era” [11].

In order to overcome the adverse effects of antimicrobial treatment at the beginning of the XX century, Paul Erlich developed the “golden bullet” concept, which, according to the author, is hypothetically an antibacterial agent carried exactly to the infectious focus and which acts only on the microbial pathogenic agent, being harmless to the cells of the host organism [12]. At present investigations are undertaken in order to develop an alternative antibacterial therapy to which bacteria will not be able to develop resistance [7]. Administration of bacteriophages [13, 14], and application of antimicrobial photodynamic therapy [15, 16] are some examples of such relatively new therapies. Photodynamic therapy (PDT) is based on photochemical reactions triggered by interaction of a photosensitive substance (photosensitizer, PS) and light with a certain wavelength, resulting in the formation of reactive oxygen species (ROS) [19-24].

It is to be noted that the frequency of diseases of the oral cavity in children and young people in the Republic of Moldova ranges from 76.07% to 87.81%, while in adults this indicator exceeds 90%, thus rendering these diseases social dimensions with important economic costs [17]. This stimulates the development and application of modern technologies of treatment and prophylaxis to reduce the prevalence and incidence of diseases and to improve the quality of life. Considering that microbial factor plays a crucial and essential role in the emergence and evolution of dental diseases, it is indisputable and indubitable the research actuality of photodynamic therapy application in treatment and prevention of these diseases. Based on the literature data analysis, in this article we tried to highlight the advantages of antimicrobial photodynamic therapy application in the treatment of diseases of the oral cavity caused by biofilms in relation to antibacterial therapy application.

The objective of the work was to perform a systematized literature analysis and synthesis of the antimicrobial photodynamic therapy effect on oral biofilm.

### Material and methods

To achieve the given objective, the online database of PubMed search engine (US National Library of Medicine, National Institute of Health) was searched for scientific publications by keywords “*photodynamic therapy*”, “*antimicrobial photodynamic therapy*”, “*dentistry*”, “*biofilms*”, “*oral biofilm*” and “*dental plaque*” [18].

After examining the titles of articles found, only works that could possibly include accounts of current concepts regarding the action of photodynamic therapy on microorganisms of the oral cavity were selected. For advanced selection of literature sources, the following filters were applied: works published by February 2015, articles in English, Romanian, French and Russian. Original research articles were selected (conducted

asupra microorganismelor cavității orale. Pentru selectarea avansată a surselor bibliografice, au fost aplicate următoarele filtre: lucrările publicate până în februarie 2015, articole de limbă engleză, română, franceză și rusă. Au fost selectate articole originale de cercetare (efectuate în condiții clinice, experimentale și *in vitro*), de tip metaanaliză și reviste sistematizate de literatură. Bibliografia articolelor selectate a fost, de asemenea, studiată, cu intenția de a găsi alte articole relevante scopului propus. Rezultatele studiilor recente au avut prioritate față de ipotezele mai vechi. Rezultatele obținute în cadrul studiilor multicentrice au avut prioritate față rezultatele studiilor monocentrice sau cu rezultate neconfirmate ori contradictorii. Concluziile revistelor de literatură existente au fost examinate critic. Ulterior, informația a fost sistematizată cu prezentarea principalelor aspecte ale viziunii contemporane asupra: mecanismului de acțiune a terapiei fotodinamice, efectului terapiei fotodinamice asupra microorganismelor și rezultatelor aplicării terapiei fotodinamice antibacteriene în tratamentul afecțiunilor cavității orale. Din lista de publicații, generată de motorul de căutare, au fost excluse publicațiile duplicate și cele care nu au fost accesibile pentru vizualizare.

### Rezultate

În rezultatul prelucrării informației în baza de date PubMed conform criteriilor căutării (publicate până în februarie, 2015), au fost găsite 1680 de articole care abordează tematica terapiei fotodinamice antimicrobiene. La necesitate (pentru a clarifica unele aspecte), a fost consultată literatura adițională. După analiza primară a titlurilor, 352 de articole au fost calificate eventual relevante pentru tema *review*-ului dat; după trecerea lor repetată în revistă, au fost selectate, în cele din urmă, 162 de publicații relevante scopului trasat. În bibliografia finală a lucrării au intrat 147 de publicații.

### Mecanismul de producere a efectului fotodinamic

În decursul ultimilor decenii, TFD se aplică cu succes în tratamentul și prevenirea maladiilor oncologice, infecțioase și afecțiunilor inflamatorii. Reacția fotodinamică este inițiată de acțiunea dozelor adecvate de energie luminoasă asupra substanțelor fotosensibile în prezența oxigenului din țesuturi, iar efectul fotodinamic distructiv are un caracter localizat, acțiunea bactericidă fiind limitată de zona acțiunii iradierii laser [19-24].

Mecanismul efectului fotodinamic se explică prin producerea unui lanț de reacții fotochimice. Reacțiile fotodinamice sunt inițiate de acțiunea dozelor adecvate de energie luminoasă asupra substanțelor fotosensibilizante în prezența oxigenului în țesut. Astfel, atunci când un FS absoarbe un foton, un electron trece de la starea inițială la o stare electronic excitată, singletică a moleculei. Într-o perioadă foarte scurtă de timp, de circa  $10^{-10}$ - $10^{-12}$  s, molecula excitată conferă un surplus de energie electronică și vibratorie mediului înconjurător [25-28].

În rezultatul procesului de conversie internă, toate moleculele, indiferent de starea electronică-vibratorie în care au fost transferate de către fotonul absorbit, trec la un subnivel inferior de vibrație a primei stări de excitare singletică. De la această stare provin toate procesele fotofizice concurente ul-

in clinical, experimental and in vitro conditions), meta-analysis type and systematized literature reviews. The bibliography of selected articles was also studied in order to find other articles relevant to the intended purpose. The results of recent studies had priority over older assumptions, as well as multicentric studies over monocentric studies. The results obtained in several studies had priority over conflicting or unconfirmed studies. Conclusions of existing literature reviews were critically examined. Subsequently, information was systematized highlighting the main aspects of contemporary vision on: mechanism of action of photodynamic therapy, photodynamic therapy effect on microorganisms and results of antibacterial photodynamic therapy application in treatment of diseases of the oral cavity. The publications that were not accessible for viewing were excluded from the list of publications generated by the search engine.

### Results

As a result of information processing in PubMed database according to search criteria (published by February 2015), 1680 articles were found on antimicrobial photodynamic therapy. If necessary (to clarify some aspects) additional literature was consulted. After having analyzed the titles, 352 articles were classified as possibly relevant to the given review theme. At the end, 162 relevant publications were selected. The final references consist of 147 publications.

### Mechanism of photodynamic effect

Over the past decades, PDT (*photodynamic therapy*) is successfully applied in treatment and prevention of oncological, infectious and inflammatory diseases. Photodynamic reaction is initiated by the action of adequate doses of light energy on photosensitive substances in the presence of oxygen in tissue, while the destructive photodynamic effect has a localized character, the bactericidal action being limited by the action of laser irradiation area [19-24].

The mechanism of the photodynamic effect is explained by the production of a series of photochemical reactions. Photodynamic reactions are initiated by the action of adequate doses of light energy upon photosensitizing substances in the presence of oxygen in the tissue. Thus, when a PS absorbs a photon, an electron moves from the initial state to an excited singlet electronic state of the molecule. In a short period, about  $10^{-10}$ - $10^{-12}$  s the excited molecule offers an electronic and vibrational power surplus to the environment [25-28].

As a result of internal conversion, all molecules, regardless of the electronic-vibrational state into which they have been transferred by the absorbed photon, switch to a lower vibrational sublevel of the first excited singlet state. All subsequent concurrent photo physical processes come from this state, which ultimately lead to deactivation of the excited molecule. Simultaneously with the singlet levels, the molecule has an electronic triplet level, located at a lower level on energy scale [20, 21, 24, 29].

The molecule is subjected to photochemical transformations only in the excited electronic state, which may be caused by the absorbed light, while the amount of formed photoprod-



terioare, care, în cele din urmă, duc la dezactivarea moleculei excitate. Simultan cu nivelurile singletice, molecula are un nivel electronic triplet, situat la un nivel mai inferior pe scara energiilor [20, 21, 24, 29].

Molecula este supusă transformărilor fotochimice doar în starea electronic excitată, care poate fi provocată de lumina absorbită, iar cantitatea fotoproduselor formate este determinată de doza de iradiere optică [25, 26, 30-32].

În componența sistemelor biologice se conțin atât cromofori produși în decursul dezvoltării evolutive pentru captarea și utilizarea luminii (pigmenții fotosintetici, fitocromul, rodopsina), cât și cromofori care sunt participanți ai reacțiilor metabolice și, totodată, sunt capabili să suporte transformări fotochimice (proteine, acizi nucleici, coenzime, vitamine).

Substanțele fotosensibilizante în stare electronică excitată interacționează cu substraturile biologice prin două tipuri de reacții. În reacțiile de tip I, FS interacționează cu moleculele limitrofe ale substratului, ceea ce duce la transferul electronului sau atomului de hidrogen. În rezultat, se formează radicali ai moleculelor biologice, care intră în reacțiile chimice ulterioare cu oxigenul sau alte molecule. În cazuri mult mai rare, FS poate transfera electronul la oxigen, generând, astfel, anionul radical superoxid. În reacțiile de tip II, are loc transferul energiei excitației electronice de la FS către molecula limitrofă a substratului. De regulă, în astfel de reacții, FS aflat într-o stare tripletă, interacționează cu molecula de oxigen și o transformă într-o stare singletă de excitație electronică. Probabilitatea tipului reacției de fotosensibilizare, care va avea loc (I sau II), este determinată atât de natura chimică a FS și a substratului, cât și de concentrația relativă a oxigenului în substrat [22, 29, 31-34].

#### *Efectul fotodinamic asupra microorganismelor*

La elaborarea terapiei fotodinamice antimicrobiene, TFDA (l. engl. *antimicrobial photodynamic therapy*, APDT), s-a folosit experiența acumulată în TFD a tumorilor. Din primele etape de studiere a efectelor TFD, s-a constatat, că interacțiunea luminii cu unii coloranți poate fi fatală pentru un șir de microorganisme [35-39].

Fizioterapeutul danez Niels Finsen a pus bazele științifice ale fototerapiei. În anul 1887, a fost efectuat primul studiu al efectelor luminii asupra tulpinilor de *Salmonella typhi* și *Bacillus anthracis*. Finsen N. și colegii (1889), au demonstrat că reducerea creșterii bacteriilor este influențată, preponderent, de durata și puterea efectului fotodinamic. Cea mai impunătoare fotoinactivare a acestor microorganisme s-a remarcat la utilizarea iradierii UV sau a luminii albastre [19].

După o perioadă mai îndelungată de timp, s-a constatat că sensibilitatea bacteriilor Gram-negative și Gram-pozitive la TFD este diferită. Moleculele neutre sau cele încărcate pozitiv ale fotosensibilizatorilor interacționează eficient cu microorganismele Gram-pozitive; trecând prin stratul poros de peptidoglicani și acizi teichoici din peretele celular, ele provoacă inactivarea fotodinamică a bacteriilor sub acțiunea luminii. Tulpinile Gram-negative s-au dovedit a fi mai puțin sensibile la acțiunea TFD, întrucât moleculele fotosensibilizatorilor se leagă doar cu straturile exterioare ale membranei celulare.

ucts is determined by the dose of optical irradiation [25, 26, 30-32].

The biological systems contain both chromophores produced during the evolutionary development to capture and use light (photosynthetic pigments, phytochrome, rhodopsin) and chromophores that participate in metabolic reactions, and are also able to support photochemical transformations (proteins, nucleic acids, coenzymes, vitamins).

Photosensitizing substances (PS) in the excited electronic state interact with biological substrates by two types of reactions. In type I reactions PS interact with neighboring molecules of the substrate, which leads to electron or hydrogen atom transfer. As a result, radicals of biological molecules are formed which enter into the subsequent chemical reactions with oxygen or other molecules. In rare cases PS can transfer electrons to oxygen, thereby generating superoxide radical – anion. Electronic excitation energy transfer from PS to molecule adjacent to the substrate occurs in type II reactions. As a rule, in such reactions PS, being in a triplet state, interact with the molecule of oxygen and convert it into an excited singlet electronic state. The probability of the photosensitivity reaction type to take place (I or II) is determined by both the chemical nature of PS and substrate and the relative concentration of oxygen in the substrate [22, 29, 31-34].

#### *Photodynamic effect on microorganisms*

The elaboration of antimicrobial photodynamic therapy (APDT) was based on the experience accumulated in PDT of tumors. From the earliest stages of PDT development, it was known that the combination of light and some dyes can be fatal for a number of microorganisms [35-39].

Danish physiotherapist Niels Finsen founded the science of phototherapy. The first study of light effects on microorganisms was carried out in 1887 on *Salmonella typhi* and *Bacillus anthracis*. Finsen *et al.* showed that reduction of bacterial growth is mainly influenced by the duration and strength of photodynamic effect. The most impressive photoinactivation of these microorganisms was noted when using UV or blue light irradiation [19].

After a long period of time it was found that the sensitivity of Gram-negative and Gram-positive bacteria to PDT is different. The neutral or positively charged molecules of the photosensitizers interact effectively with Gram-positive microorganisms and, passing through the porous layer of peptidoglycans and teichoic acids from the cellular wall, cause the photodynamic inactivation of bacteria under the action of light. Gram-negative strains have been shown to be less sensitive to PDT action, since photosensitizer molecules bind only to the outer layers of the cell membrane. The outer membrane of these bacteria forms a physical and functional barrier between the cell and the external environment, without allowing PS molecules to penetrate inside them [23, 40-45].

Photochemical destruction of bacteria occurs through single impact mechanisms, as well as through mechanisms with multiple impact. The targets of photodynamic effect, are determined to a large extent by the selectivity of accumulation and degree of absorption of dyes in various cellular structures.

Membrana externă a acestor bacterii formează o barieră fizică și funcțională dintre celulă și mediul extern, fără a permite moleculelor FS să pătrundă în interior [23, 40-45].

Distrugerea fotochimică a bacteriilor are loc atât prin mecanisme cu impact unic, cât și prin cele cu impact multiplu. Țintele efectului fotodinamic, în mare măsură, sunt determinate de selectivitatea acumulării și gradul de absorbție a coloranților în diferite structuri celulare. De exemplu, compușii acridinei se acumulează, preponderent, pe suprafața cromosomilor și provoacă ruperea lor, iar porfirinele se acumulează activ în lizozomi, deteriorând structura acestora [27, 28]. Se presupune că, în rezultatul impactului fotodinamic, survine lizarea celulei bacteriene prin două căi: deteriorarea aparatului genetic și lizarea membranei citoplasmice (MC), urmată de deteriorarea componentelor celulare, inactivarea proteinelor de transport sau a enzimelor MC [29, 46, 47].

Cercetările din ultimii ani ne permit să afirmăm că impactul TFD asupra microorganismelor provoacă deteriorarea ADN-ului bacterian. Cauza principală de deteriorare fotodinamică a acizilor nucleici este fotooxidarea selectivă a compușilor alcalini de guanină. În această reacție, ambele inele ale guaninei se rup și se formează guanidina, acidul parabanic, dioxidul de carbon și unele produse deocamdată neidentificate, cu un randament cuantic de  $10^{-4}$  [34, 48-53].

Fotooxidarea acizilor nucleici în sistemele model a fost studiată minuțios în condițiile prezenței hematoporfirinei. S-a demonstrat că, în caz de valori ridicate ale pH-ului, se produce fotooxidarea compușilor alcalini, iar în cazul valorilor fiziologice ale pH-ului – doar fotooxidarea guaninei și, parțial, a timinei. S-a stabilit că ADN și ARN se oxidează lent la valorile fiziologice ale pH-ului, însă viteza lor de oxidare crește semnificativ în uree – solventul în care se perturbază structura acizilor nucleici. De menționat că, în sistemele modelate, este identificată posibilitatea reticulării fotodinamice a triptofanului și cisteinei cu ADN-ul și, de asemenea, a guaninei cu proteinele [23].

Deteriorarea structurii și a compoziției chimice a acizilor nucleici conduce la tulburări semnificative ale activității lor biologice. În rezultatul interacțiunii luminii cu substanțele fotosensibilizatoare de natură chimică diferită, are loc denaturarea structurii spiralate a ADN-ului, precum și rupturi ale legăturilor dintre nucleotide și distrugerea plasmidelor, aceste modificări fiind constatate atât la microorganismele Gram-pozitive, cât și la cele Gram-negative. S-a presupus că FS, capabili să se lege efectiv de spirala ADN-ului, provoacă mai rapid fotodistrucția ADN-ului [23, 44, 50].

Fotolizarea celulelor este explicată nu doar prin modificarea structurii ADN-ului. De exemplu, a fost demonstrat faptul că tulpina de *Deinococcus radiodurans* este foarte sensibilă la acțiunea TFD, în pofida potențialului înalt al sistemelor reparatorii ale acestei bacterii [54, 55]. G. Bertoloni și coaut. (2000) [56] au semnalat faptul că, în rezultatul interacțiunii luminii și a substanțelor fotosensibilizatoare, survine deformarea proteinelor membranei citoplasmice, iar un număr impunător de cercetători au depistat tulburarea sintezei peretelui celular, apariția structurilor multilamelare în citoplasmă și intensificarea eliberării ionilor  $K^+$  din celula microbiană [56, 57, 58,

For example, acridine compounds accumulate mainly on the chromosome surface and cause them to break, and porphyrins accumulate actively in lysosomes damaging their structure [27, 28]. It is assumed that as a result of photodynamic impact bacterial cell lysis occurs in two ways: damage to the genetic apparatus and lysis of the cytoplasmic membrane (CM), followed by the damage to cellular components, inactivation of transport proteins or CM enzymes [29, 46, 47].

Recent researches allow us to state that PDT impact on microorganisms causes bacterial DNA damage. Selective photo oxidation of guanine alkaline compounds is the main cause of photodynamic damage to nucleic acids. In this reaction both guanine rings rupture and guanidine, parabanic acid, carbon dioxide and some unidentified products are formed with a quantum yield of  $10^{-4}$  [34, 48-53].

Photo oxidation of nucleic acids in model systems has been thoroughly studied in the presence of hematoporphyrin. It was shown that photo oxidation of alkaline compounds occurs if there are high values of pH, and if there are physiological pH values – only photo oxidation of guanine and thymine partially occurs. It has been determined that DNA and RNA oxidize slowly at physiological pH values, but their oxidation rate significantly increases in urea – the solvent in which the structure of nucleic acids is disturbed. It is to be mentioned that the possibility of photodynamic crosslinking of tryptophan and cysteine with DNA as well as guanine with proteins can be identified in the model systems [23].

Damage to the structure and chemical composition of nucleic acids leads to significant disturbances of their biological activity. As a result of the interaction of light with photosensitizers of different chemical nature, distortion of DNA spiral structure occurs, the links between nucleotides rupture and plasmids are destroyed. These changes are observed in both Gram-positive and Gram-negative microorganisms. It was assumed that PS able to effectively bind to DNA helix, cause faster DNA photostruction [23, 44, 50].

Photolysis of cells is accounted not only for modification of the DNA structure. For example, it has been proven that *Deinococcus radiodurans* strain is very sensitive to PDT action, despite the high potential of the restorative systems of this bacterium [54, 55]. In 2000, G. Bertoloni *et al.* reported that deformation of cytoplasmic membrane proteins occurs as a result of the interaction of light and photosensitizers. A large number of researchers have found the disturbance of the cellular wall synthesis, appearance of multilamellar structures in the cytoplasm and an increased release of  $K^+$  ions from the microbial cell [45, 56-58]. The quantum yield of photodynamic inactivation of proteins is  $10^{-3}$ . A large amount of data has been obtained which attests that singlet oxygen is the primary intermediate in photochemical reaction, followed by the damage to the cytoplasmic membrane enzymes [27, 28].

Protein irradiation with visible spectrum light in the presence of PS usually causes, the disturbance of the structure of macromolecules, simultaneously oxidizing the residues of amino acids: histidine, tryptophan, tyrosine, methionine and cysteine. As a result, protein cross-linking occurs in the protein structures, at the same time breaking of the peptide and

45]. Randamentul cuantic al inactivării fotodinamice a proteinelor constituie  $10^{-3}$ . S-au obținut numeroase dovezi care atestă că oxigenul singlet este principalul intermediar în reacția fotochimică, urmată de deteriorarea enzimelor membranei citoplasmatică [27, 28].

Iradieră proteinelor cu lumina vizibilă a spectrului în prezența FS, provoacă, de regulă, dereglarea structurii macromoleculilor, oxidând, simultan, resturile aminoacizilor: histidina, triptofanul, tirozina, metionina și cisteina. În consecință, în structurile proteice are loc reticularea proteinelor, dar nu și ruperea legăturilor peptidice și disulfurice. S-a constatat că se poate obține o lizare diferențiată și selectivă a aminoacizilor, variind tipul și proprietățile chimice ale pigmentilor [59, 60].

De regulă, în urma formării compușilor fotochimici stabili, se produc schimbări conformaționale ale macromoleculii proteice. Rezultatul modificărilor structurale reprezintă o dereglare a activității funcționale a proteinelor (activitatea catalitică, imunologică, hormonală), care poate fi cauzată și de distrugerea directă a resturilor de aminoacizi, localizați în centrul activ al enzimei [61].

Este deja demonstrat faptul că, lumina absorbită de FS provoacă oxidarea acizilor grași, iar eficiența fotooxidării este proporțională cu creșterea gradului lor de nesaturare. Colesterolul, de asemenea, se supune cu ușurință procesului de fotooxidare. Oxigenul singlet, generat de FS în timpul iradierii optice, distruge rapid legătura dublă din inelul de ciclopentanperhidrofenatren al colesterolului membranar, conducând la formarea compusului hidroperoxid. Constanta vitezei unei astfel de reacții a colesterolului membranar este superioară celei, care implică acizii grași nesaturați ai fosfolipidelor. Reacțiile de fotooxidare ale acizilor grași nesaturați ai fosfolipidelor și ai colesterolului sunt asemănătoare reacțiilor care au loc în timpul oxidării peroxidice a lipidelor (OPL). Așadar, mecanismul acțiunii fotodinamice se bazează pe generarea formelor libere de oxigen în rezultatul interacțiunii dintre fotoni și moleculele fotosensibilizatorului. Formele active ale oxigenului sunt capabile să provoace oxidarea peroxidică a lipidelor care intră în componența membranei citoplasmatică, compromițând, astfel, integritatea celulei și ducând la moartea ei [44, 62-64].

Până în prezent, a fost cercetat minuțios *in vitro* impactul TFD asupra diferitor specii de bacterii. A fost evaluată eficiența utilizării unui număr impunător de FS fotoactivați, cu diverse surse de lumină, în fotodistrucția agenților patogeni ai bolilor infecțioase. Astfel, s-a stabilit că bacteriile *Propionibacterium acnes* acumulează acidul 5-aminolevulinic, substanță predecesoare porfirinelor. Fluorescența caracteristică acestor microorganisme în zona roșie a spectrului se utilizează în diagnosticarea acneei și pentru TFD, la tratamentul acestei afecțiuni. Acidul 5-aminolevulinic se sintetizează și de *Helicobacter pylori*, determinând sensibilitatea acestei tulpini la acțiunea iradierii cu spectrul albastru [38, 65-74]. Malik Z. și colab. (1990), în studiul devenit astăzi clasic, a semnalat efectul bactericid al TFD asupra *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli* și *Mycoplasma hominis* [73, 74].

Actualmente, se întreprind un șir de cercetări în scopul majorării eficienței terapiei antibacteriene cu utilizarea FS

protein disulfide links does not occur. It has been found that a differentiated and selective lysis of the amino acids can be obtained, varying the type and chemical properties of the pigments [59, 60].

Usually, after stable photochemical compounds are formed, some conformational changes of the protein macromolecules occur. The result of the structural changes is the disturbance in the functional activity of proteins (catalytic, immunological, hormonal activity), which may be also caused by direct destruction of the amino acid residues located in the active enzyme center [61].

It has already been proven the fact that light absorbed by PS causes oxidation of fatty acids, and the efficiency of photooxidation is proportional to the growth of its unsaturation degree. Cholesterol is also easily affected by photooxidation. Singlet oxygen generated by PS during the optical irradiation quickly destroys the double bond of cyclopentanoperhydrophenanthrene ring of membrane cholesterol, leading to the formation of hydroperoxide compound. The constant speed of such a reaction of membrane cholesterol is superior compared to that of the unsaturated fatty acids of phospholipids. Photo-oxidation reactions of unsaturated fatty acids of phospholipids and cholesterol are similar to the reactions occurring during the lipid peroxidation (OLP). Thus, photodynamic mechanism of action is based on the generation of free oxygen forms by the interaction between light photons and photosensitizer molecules. The active forms of oxygen are able to cause lipid peroxidation constituting the cytoplasmic membrane, thus compromising the integrity of the cell and causing its death [44, 62-64].

It has been thoroughly researched so far the PDT impact on different species of bacteria *in vitro*. It was evaluated the efficiency of use of a large number of photoactivated PS with different light sources during photodestruction of pathogens of infectious diseases. Thus, it has been established that *Propionibacterium acnes* bacteria accumulate 5-aminolevulinic acid, a predecessor substance of porphyrins. The fluorescence characteristic of these microorganisms in the red region of the spectrum is used in the diagnosis of acne and PDT in the treatment of this disease. 5-aminolevulinic acid is also synthesized in the cells of *Helicobacter pylori*, causing the sensitivity of the strain to the action of irradiation of the blue spectrum [38, 65-74]. Thus, Malik Z. *et al.* (1990), in the study which has become classic, reported the bactericidal effect of PDT on *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli* and *Mycoplasma hominis* [73, 74]. Currently a number of researches are being undertaken in order to increase the effectiveness of antibacterial therapy with the use of PS by changing their photochemical properties with coherent and incoherent radiation of different range. Thus Bilski P. *et al.* (2000) demonstrated in an *in vitro* study that endogenous vitamin B6 (pyridoxine) in combination with UV-diapason (400-550 nm) non-laser irradiation exerts a marked toxic effect on *Cercospora* fungi [75].

Photodeterioration of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* in the presence of chlorine E6 was investigated by Fomichev A. *et al.* in 2012. The bacterial suspensions of the strains studied



prin modificarea proprietăților lor fotochimice, cu iradierea coerentă și incoerentă, de diapazon diferit. Astfel, Bilski P. și colab. (2000), au demonstrat în studiul efectuat în condiții *in vitro*, că vitamina endogenă B6 (piridoxină), în combinație cu iradierea non-laser în spectrul UV (400-550 nm), exercită un efect toxic pronunțat asupra fungilor *Cercospora* [75].

Fotodeteriorarea tulpinilor de *Escherichia coli* și *Bacillus subtilis* în prezența clorinei E6, a fost investigată de Fomichev A. și colab. în anul 2012. Suspensiile bacteriene ale tulpinilor studiate au fost incubate timp de 60, 30, 15 și, respectiv, 5 min cu clorina E6, concentrația căreia a constituit  $10^{-7}$  M/l. În calitate de sursă de iradiere, a fost folosită lumina lămpii incandescente, trecută printr-o serie de filtre de 600-700 nm. Putea iradierii a constituit  $50 \text{ W/m}^2$ . Timpul de iradiere a variat între 1 și 90 de minute. S-a demonstrat că, după o expunere îndelungată, procesul de fotodistrucție a *Escherichia coli* și *Bacillus subtilis* se supune legii exponențiale. Pentru anihilarea *Escherichia coli*, este necesară incubarea celulelor în colorant, durata optimă fiind până la 30 de minute. Pentru *B. subtilis*, acest fenomen nu s-a constatat. Rezultate similare au fost obținute, anterior, și de Strahovskaia V. și colab (1999) [35-37, 76].

Schneider J. și colab., în anii 1993 și 1999, au demonstrat că efectuarea TFD *in vitro*, cu aplicarea albastrului de metilen și iradierea simultană cu lumină albă (400-700 nm),  $10 \text{ J/cm}^2$ , provoacă inactivarea ARN-ului Qb-bacteriofagului prin intermediul reticulării acestuia cu proteinele plasmatice [77-78].

La momentul actual, în TFD se aplică pe scară largă acidul 5-aminolevulinic, care este un predecesor al porfirinelor endogene și provoacă foto-inactivarea *Escherichia coli* [79], *Propionibacterium acnes*, *Candida guilliermondii*, *Haemophyllus parainfluenzae* [23, 80].

Un rol incontestabil în studierea eficienței TFD antimicrobiene este acordat protocolului studiului bacteriologic. Astfel, mediile de creștere, bogate în peptoni, reduc sensibilitatea microorganismelor la acțiunea reacțiilor fotochimice. S-a remarcat influența conținutului cantitativ și calitativ al proteinelor în mediu. În anul 2010, Malik R. și colab., au raportat eficiența utilizării în calitate de fotosensibilizator al amestecului de hemină și porfirină în TFD. Această compoziție exercită un efect fototoxic asupra *Staphylococcus aureus* și altor bacterii Gram-pozitive. Totodată, utilizarea separată a componentelor amestecului a manifestat un efect bacteriostatic limitat [81].

Numeroase lucrări sunt consacrate studiului efectului aplicării fotosensibilizatorilor încărcăți pozitiv simultan cu iradierea optică, pentru a suprima microorganismele Gram-pozitive și Gram-negative. A fost studiat efectul albastrului de toluidină asupra microflorei cavității orale, precum și asupra *Staphylococcus aureus* și *Helicobacter pylori*. S-a constatat că faza de creștere a culturii microbiene nu influențează eficiența TFD [43].

Cercetătorii italieni sub conducerea lui Jori G. (2004), au utilizat fotosensibilizatorii din clasa porfirinelor pentru foto-inactivarea tulpinilor de *Escherichia coli* și *Vibrio anguillarum*. S-a remarcat faptul că, colorantul se leagă insuficient de membrana exterioară a acestor microorganisme, deoarece îndepărtarea lui înainte de iradiere reduce eficiența TFD. Se presupune că impactul primelor doze de lumină asupra fotosensibilizatorului legat de membrană provoacă deteriorarea locală,

were incubated for 60, 30, 15 and 5 min with chlorine E6, concentration of which was  $10^{-7}$  M/l. The incandescent lamp light was used as a source of irradiation, being passed through a series of filters (600-700 nm). The irradiation power was  $50 \text{ W/m}^2$ . The irradiation time varied between 1 and 90 minutes. It has been shown that after exposure over a long period of time, the photodestruction of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* is subject to exponential law. In order to annihilate *Escherichia coli* it is necessary to incubate the cells in the dye most preferably for up to 30 minutes. This phenomenon was not found in *B. subtilis*. Similar results were obtained by Strahovskaia V. et al. (1999) [35-37, 76].

Schneider J. et al., in 1993 and 1999 showed that performing PDT *in vitro* with application of methylene blue and simultaneous irradiation with white light (400-700 nm),  $10 \text{ J/cm}^2$  causes inactivation of RNA Qb-bacteriophage through its plasma protein crosslinking [77-78].

Currently 5-aminolevulinic acid is widely applicable in PDT which is a predecessor of endogenous porphyrins and causes photo-inactivation of *Escherichia coli* [79], *Propionibacterium acnes*, *Candida guilliermondii*, *Haemophyllus parainfluenzae* [23, 80].

The bacteriological study protocol plays an undeniable role in the study of antimicrobial PDT efficiency. Thus, the growth media rich in peptones reduce the microorganism sensitivity to the action of photochemical reactions. It was noted the quantitative and qualitative content influence of protein in the environment. In 2010, Malik R. et al. reported the efficiency of use of hemin and porphyrin mixture in PDT as photosensitizer. The composition exerts a phototoxic effect on *Staphylococcus aureus* and other Gram-positive bacteria. However, the use of each of the mixture components separately had a limited bacteriostatic effect [81].

A large number of works are devoted to study of the effect of application of photosensitizers positively charged simultaneously with optical radiation to suppress Gram-positive and Gram-negative microorganisms. The effect of toluidine blue has been studied on the oral cavity microflora, as well as on *Staphylococcus aureus* and *Helicobacter pylori*. It has been found that the microbial culture growth phase does not affect the PDT efficiency [43].

In 2004, Italian researchers under the leadership of G. Jori used photosensitizers of the porphyrin class for photo-inactivation of *Escherichia coli* and *Vibrio anguillarum*. It was noted that insufficient dye binds to the outer membrane of these microorganisms because the removal of dye before irradiation reduces the effectiveness of PDT. It is assumed that the impact of the first dose of light on membrane-bound photosensitizer causes local damage, which, in turn, enables new dye molecules to penetrate deeper into the cell. In 2006, the authors found that incubation of bacteria with zinc derivatives of pyrimidine phthalocyanine increases the sensitivity of these microorganisms to hydrophobic antibiotics and reduces the absorption of endogenous porphyrins by the cells [82, 83].

It was supposed, that the formation of singlet oxygen in the environment of the cell is enough to ensure the bactericidal effect of PDT on the Gram-negative microorganisms. According



cea ce, la rândul ei, permite noilor molecule ale colorantului să pătrundă în interiorul celulei. În anul 2006, aceiași autori au constatat faptul că incubarea bacteriilor cu derivatele de zinc ale pirimidinftalocianei sporește sensibilitatea acestor microorganisme la antibioticele hidrofobe și reduce absorbția porfirinelor endogene de către celule [82, 83].

S-a presupus faptul că, pentru a asigura efectul bactericid al TFD asupra microorganismelor Gram-negative, este suficient formarea oxigenului singlet în mediul înconjurător al celulei. Conform datelor obținute de Dahl T. (1989), oxigenul singlet, format într-o cantitate suficientă în imediata apropiere de membrana exterioară, difuzează în celulă și-i distruge diverse structuri [84].

De asemenea, se admite că prin iradierea unei zone limitate a macroorganismului, impactul fotodinamic poate atinge nu numai agentul infecțios, dar și microorganismele simbiotice. În același timp, utilizarea TFD oferă noi oportunități pentru o ușoară corecție a numărului de reprezentanți ai microflorei normale, stimulării biologice a proceselor, ce se desfășoară în cadrul comunității microbiene. Totuși, datele disponibile deocamdată nu pot clarifica aceste aspecte.

#### *Substanțele fotosensibilizante*

Fotosensibilizatorii (FS) sunt molecule ce absorb lumina și induc, în consecință, reacții chimice. Capacitatea de a absorbi lumina este determinată de prezența în molecule a grupărilor cromofore care, de regulă, conțin nuclee ciclice. Sunt cunoscute mai mult de 400 de substanțe ce posedă proprietăți de FS. Substanțele naturale cu capacitate de fotosensibilizator sunt clorofilele, ficobilinele, porfirinele și produsele intermediare ale sintezei lor, un șir de antibiotice, chinina, riboflavina etc. Unii fotosensibilizatori acționează doar în prezența oxigenului, producând un efect fotodinamic [19, 85-90].

În rezultatul analizei rezultatelor unui număr mare de cercetări experimentale și clinice, au fost formulate criteriile biologice (toxice și farmacocinetice), fotofizice și chimico-tehnologice pentru selectarea unui FS optim, care include [50, 73, 74, 91-96]:

- toxicitate redusă în doze terapeutice;
- selectivitate înaltă de acumulare în celulele microbiene;
- eliminare rapidă a FS din țesuturi;
- absorbție maximă într-un anumit diapazon spectral;
- un randament cuantic înalt de formare *in vivo* a oxigenului singlet;
- accesibilitate de extragere sau sinteză, compoziție chimică omogenă;
- solubilitate bună în apă sau în lichide;
- stabilitate la acțiunea luminii și la păstrare.

În prezent, se efectuează cercetări pentru identificarea unor astfel de substanțe fotosensibilizante printre derivații clorinelor, bacterioclorinelor, purpurinelor, benzoporfirinelor, texafirinelor, etiopurpurinelor, naftalo- și ftalocianinelor [71, 97, 98].

#### *Fenotiazinele*

Din momentul elaborării TFD și până în prezent, acești compuși sunt cel mai frecvent utilizați. Din acest grup de

to the data obtained by T.Dahl (1989), singlet oxygen formed in sufficient quantity in the vicinity of the outer membrane diffuses into the cell and destroys various cellular structures [84].

It is assumed that by irradiating a limited area of the macroorganism, photodynamic impact can reach not only the infectious agent, but symbiotic microorganisms as well. At the same time, the use of PDT provides new opportunities for a slight correction of the number of representatives of the normal microflora, biological stimulation of processes that take place within the microbial community. The literature review has revealed that information on the impact of different types of LED and laser irradiation on normal bacterial microflora is insufficient.

#### *Photosensitizing substances*

Photosensitizers (PS) are molecules able to absorb light and to induce chemical reactions. The ability to absorb light is determined by the presence of chromophore groups in the molecule which usually contain cyclic nuclei. There are more than 400 known substances possessing properties of PS. Chlorophylls, phycobilins, porphyrins and their synthesis intermediates, as well as a number of antibiotics, quinine, riboflavin, etc. are natural substances possessing photosensitizing capacity. Some photosensitizers act only in the presence of oxygen, producing a photodynamic effect [19, 85-90].

As a result of the analysis of a large number of clinical and experimental researches, biological (toxic and pharmacokinetic), photophysical and chemical-technological criteria were formulated for selecting an optimal PS, which include the following [50, 73, 74, 91-96]:

- low toxicity at therapeutic doses;
- high selectivity of accumulation in microbial cells;
- rapid elimination of PS from tissues;
- maximum absorption in a given spectral range;
- a high quantum yield of singlet oxygen formation *in vivo*;
- availability of extraction or synthesis, homogeneous chemical composition;
- good solubility in water or liquids;
- stability to the action of light and storage.

Currently research is carried out to identify such photosensitizing substances among the derivatives of chlorines, bacteriochlorines, purpurins, benzoporphyrins, texaphyrins, etiopurpurins, naphthalo- and phthalocyanines [71, 97, 98].

#### *Phenothiazines*

These compounds have been most commonly used since PDT elaboration and so far. This group of compounds includes: pink Bengal, indocyanine green, toluidine blue, methylene blue and various metal derivatives. Phenothiazines are not toxic to macroorganism cells, but at the same time they are able to actively generate singlet oxygen under the action of optical radiation and are easy to apply [41, 99, 100].

Wilson M. *et al.* (1992) demonstrated that after the processing of bacterial cultures *Porphyromonas gingivalis*, *Fusohacterium nucleatum* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* with methylene blue and subsequent action of Helium-Neon (HeNe) laser with the capacity of 7.3 mW within 80 s, the

compuși fac parte: rozul de Bengal, verdele de indocianină, albastrul de toluidină, albastrul de metilen și diverși derivați ai metalelor. Fenotiazinele nu sunt toxice pentru celulele macroorganismului, dar, totodată, sunt capabile să genereze activ oxigenul singlet sub acțiunea iradierii optice și sunt simple în aplicare [41, 99, 100].

Wilson M. și colab. (1992), au demonstrat că după prelucrarea culturilor bacteriene de *Porphyromonas gingivalis*, *Fusohacterium nucleatum* și *Actinobacillus actinomycetemcomitans* cu albastru de metilen și acțiunea ulterioară a laserului heliu-neon (HeNe) cu capacitatea de 7,3 mW în decurs de 80 s, s-a redus semnificativ numărul acestor microorganisme [101, 102]. Wilson M. și Mia N. (1993) [103], urmași de Araghizaden A. (2005) [104], au stabilit că albastrul de metilen sensibilizează celulele *Candida albicans* la acțiunea luminii și provoacă distrugerea lor sub acțiunea laserului galliu-arsenit (GaAs). Anihilarea *Candida albicans* și altor tipuri de *Candida spp.* a fost obținută doar prin prelucrarea acestor fungi cu fotosensibilizator, în combinație cu iradiere laser cu putere redusă. Această abordare necesită cercetare în continuare, fiind, eventual, o potențială metodă de tratament al candidozelor din infecția HIV [103, 104].

Millison C. (1997) a cercetat efectele TFD asupra *Helicobacter pylori*, bacterie asociată cu gastrita. Prelucrarea celulelor cu soluție de albastru de metilen (0,75 și 7,5 μg/kg) nu a avut niciun efect asupra microorganismelor, însă iradierea lor ulterioară cu lumină laser 20 J/cm<sup>2</sup> a inhibat creșterea bacteriilor cu 99% [105].

Zeina B. și colab. (2001) [106] au demonstrat efectul de anihilare a culturilor *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Candida albicans*, *Corynebacterium minutissimum*, *Propionibacterium acnes*, prelucrate, în prealabil, cu albastru de metilen (concentrație 100 μg/ml) și iradiate, ulterior, cu fasciculul de lumină de bandă largă (400-700 nm, 42 mW/cm<sup>2</sup>). S-a demonstrat că speciile *Propionibacterium acnes* și *Staphylococcus epidermidis* au fost mai puțin rezistente la acțiunea iradierii în decursul la 60 de minute, iar *Corynebacterium minutissimum* s-a dovedit a fi cea mai rezistentă specie. Utilizarea laserului cu argon (l. engl. *Argon Ion Laser*), cu maximele emisiei de 585, 610 și 630 nm și a emițătorului cu LED (664 nm), a redus numărul bacteriilor *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* și *Pseudomonas aeruginosa* după prelucrarea lor cu albastru de metilen în concentrație de 25-300 mM. De asemenea, s-a demonstrat influența suspensiilor microorganismelor asupra procesului de dimerizare a pigmentilor derivați ai ftalocianinei. Suspensiile ce conțin microorganisme Gram-pozitive au sporit constanta dimerizării de 2-5 ori, iar suspensiile microorganismelor Gram-negativ au mărit-o de la 4-20 de ori [43, 106-109].

Un număr impunător de studii au elucidat că fototerapia, în combinație cu aplicarea albastru de toluidină, este eficientă în distrugerea microorganismelor din componența biofilmului oral: *Streptococcus sanguinis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Actinobacillus (Haemophilus) actinomycetemcomitans*, *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus casei*, *Streptococcus sobrinus* și *Actinomyces viscosus* [83, 110-119].

Unele substanțe de contrast, utilizate în radio-imagistică,

number of these microorganisms reduced significantly [101, 102]. In 1993, Wilson M. and Mia N., followed by Araghizaden A. in 2005, determined that methylene blue sensitized *Candida albicans* cells to the action of light and caused their destruction under the actions of Gallium arsenide laser (GaAs). *Candida albicans* and other types of *Candida spp.* were annihilated only by processing these fungi with the photosensitizer in combination with low power laser irradiation. This approach requires further research being eventually a potential method for the treatment of candidiasis in HIV infection [103, 104].

In 1997, Millison C. investigated the effects of PDT on *Helicobacter pylori*, the bacterium associated with gastritis. The processing of cells with methylene blue solution (0.75 and 7.5 mkg/kg) had no effect on the microorganisms, but the subsequent irradiation with a 20 J/cm<sup>2</sup> dose resulted in inhibition of the bacterial growth by 99% [105].

In 2001, Zein B. et al. demonstrated the annihilation effect on the cells of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Candida albicans*, *Corynebacterium minutissimum*, *Propionibacterium acnes*, pre-processed with methylene blue (concentration of 100 μg/ml) and subsequently irradiated with the light beam tape range (400-700 nm, 42 mW/cm<sup>2</sup>). It was demonstrated that *Propionibacterium acnes* and *Staphylococcus epidermidis* species were less resistant to irradiation within 60 minutes, while *Corynebacterium minutissimum* proved to be the most resistant species. Use of argon laser (Argon Ion Laser) with maximal emission of 585, 610 and 630 nm and LED transmitter (664 nm) reduces the number of microorganisms *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* after their processing with methylene blue in concentration of 25-300 mM. It was also demonstrated the influence of microorganism suspensions on the process of dimerization of pigments which are derivatives of phthalocyanine. Suspensions containing Gram-positive microorganisms increased the dimerization constant by 2-5 times and Gram-negative microorganism suspensions increased it from 4 to 20 times [43, 106-109].

A large number of studies have revealed that phototherapy in combination with toluidine blue is effective in destroying microorganisms in the oral biofilm: *Streptococcus sanguinis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Actinobacillus (Haemophilus) actinomycetemcomitans*, *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus casei*, *Streptococcus sobrinus* and *Actinomyces viscosus* [83, 110-119].

Some contrast agents used in radio-imaging methods for diagnosis of diseases can be successfully applied as PS in PDT. Such a substance is indocyanine green used in various areas: oncology, ophthalmology, cardiology, surgery, dermatology, liver function tests and cosmetology. Use of this dye in PDT is determined by the compliance of the spectral peaks of maximal absorption and isosbestic point-for hemoglobin and oxy-hemoglobin absorption in the range of 800 nm. Low toxicity and rapid PS elimination from the body are also important: indocyanine green is rapidly cleared from the blood serum of the liver parenchymal cells [106].

pot fi aplicare cu succes în calitate de FS în TFD. O astfel de substanță este indocianina verde, utilizată în cele mai diverse domenii: oncologie, oftalmologie, cardiologie, chirurgie, dermatologie, testarea funcției hepatice și cosmetologie. Utilizarea acestui colorant în TFD este determinată de corespunderea vârfurilor spectrale ale maximei de absorbție și punctului izobestic pentru absorbția hemoglobinei și oxihemoglobinei în diapazonul 800 nm. De asemenea, este importantă toxicitatea redusă și eliminarea rapidă a FS din organism: indocianina verde este eliminată rapid din serul sanguin de celulele parenchimale hepatice [106].

#### Nanoparticulele utilizate în calitate de fotosensibilizatori

În anul 2000 a fost elaborată o nouă abordare în aplicarea terapiei fotodinamice antimicrobiene. Dezvoltarea rapidă a nanotehnologiilor a creat o mare varietate de nanoparticule pe bază de ioni de aur, argint, oxizi de siliciu și titan, care reprezintă o alternativă a generațiilor anterioare de FS. Dimensiunile nanoparticulelor variază de la 10 până la 130 nm, forma lor depinde de metoda de sinteză și poate fi sferică, stelată sau cilindrică. Spectrul de absorbție a nanoparticulelor este în funcție de componența chimică și variază de la 450 nm până la 800 nm și, de regulă, are mai multe maxime [120-122].

Pentru obținerea efectului fotodinamic țintit asupra *Staphylococcus aureus*, au fost utilizate nanoparticulele de aur. Suprafața celulei microbiene este încărcată negativ, în timp ce nanoparticulele posedă o sarcină pozitivă, ceea ce facilitează interacțiunea lor. La iradierea cu impulsuri laser, nanoparticulele absorb energie, care, ulterior, este transmisă spre peretele celular bacterian, producând deteriorarea considerabilă al acestuia [122]. De asemenea, au fost studiate efectele iradierii nanoparticulelor din oxidul de titan ( $\text{TiO}_2$ ) asupra tulpinelor *Escherichia coli*. În rezultatul cercetărilor, s-a demonstrat că nanoparticulele interacționează cu membrana exterioară a celulei bacteriene și după expunerea la lumină, produc oxigenul singlet, provocând distrugerea acesteia [120].

#### Porfirinele microbiene în calitate de fotosensibilizatori endogeni.

Unele microorganisme, capabile să acumuleze porfirine endogene, sunt suficient de sensibile la iradierea ultravioletă sau cu lumină albastră. Cel mai frecvent acest fapt este caracteristic pentru tulpinile anaerobe Gram-negative [123].

Microorganismele anaerobe ale biofilmului cavității orale din grupurile *Bacteroides*, *Prevotella*, *Porphyromonas* sintetizează propriile porfirine pe baza hemului obținut din mediul exterior sub formă de hemoglobină sau hemopexină [68, 69]. În citoplasma acestor microorganisme se acumulează pigmentul negru – hematina și protoporfirina IX, care le face sensibile față de efectului fototoxic al luminii albastre [70-72].

#### Mecanismele intracelulare de apărare

Protejarea celulei de acțiunea unuia dintre cei mai toxici derivați ai oxigenului singlet ( $^1\text{O}_2$ ) se realizează prin intermediul unor molecule variate și importante, tipurile de stingere a energiei  $^1\text{O}_2$  fiind atât fizice, cât și chimice.

Conform mecanismului chimic, stingerea  $^1\text{O}_2$  este realiza-

#### Nanoparticulele utilizate ca fotosensibilizatori

În 2000 a apărut o nouă abordare în aplicarea terapiei fotodinamice antimicrobiene. Dezvoltarea rapidă a nanotehnologiilor a creat o mare varietate de nanoparticule conținând aur, argint, siliciu și titan, care reprezintă o alternativă la generațiile anterioare de PS. Dimensiunile nanoparticulelor variază de la 10 până la 130 nm, forma lor depinde de metoda de sinteză și poate fi sferică, stelată sau cilindrică. Spectrul de absorbție al nanoparticulelor depinde de compoziția chimică și variază de la 450 la 800 nm și, de regulă, are mai multe maxime [120-122].

Pentru obținerea efectului fotodinamic țintit asupra *Staphylococcus aureus*, au fost utilizate nanoparticulele de aur. Suprafața celulei microbiene este încărcată negativ, în timp ce nanoparticulele posedă o sarcină pozitivă, ceea ce facilitează interacțiunea lor. La iradierea cu impulsuri laser, nanoparticulele absorb energie, care, ulterior, este transmisă spre peretele celular bacterian, producând deteriorarea considerabilă al acestuia [122]. De asemenea, au fost studiate efectele iradierii nanoparticulelor din oxidul de titan ( $\text{TiO}_2$ ) asupra tulpinelor *Escherichia coli*. În rezultatul cercetărilor, s-a demonstrat că nanoparticulele interacționează cu membrana exterioară a celulei bacteriene și după expunerea la lumină, produc oxigenul singlet, provocând distrugerea acesteia [120].

#### Microbii porfirici ca fotosensibilizatori endogeni

Unele microorganisme, capabile să acumuleze porfirine endogene, sunt suficient de sensibile la iradierea ultravioletă sau cu lumină albastră. Cel mai frecvent acest fapt este caracteristic pentru tulpinile anaerobe Gram-negative [123].

Microorganismele anaerobe ale biofilmului cavității orale din grupurile *Bacteroides*, *Prevotella* și *Porphyromonas* sintetizează propriile porfirine pe baza hemului obținut din mediul exterior în formă de hemoglobină sau hemopexină [68, 69]. În citoplasma acestor microorganisme se acumulează pigmentul negru – hematina și protoporfirina IX, care le face sensibile față de efectului fototoxic al luminii albastre [70-72].

#### Mecanismele intracelulare de apărare

Protejarea celulei de acțiunea unuia dintre cei mai toxici derivați ai oxigenului singlet ( $^1\text{O}_2$ ) se realizează prin intermediul unor molecule variate și importante, tipurile de stingere a energiei  $^1\text{O}_2$  fiind atât fizice, cât și chimice.

Conform mecanismului chimic, stingerea  $^1\text{O}_2$  este realizată în principal de către acizii grași saturați, lipidele, aminoacizii, nucleotidele și alte compoziții. Mecanismele chimice sunt diferite, dar în majoritatea cazurilor primul pas este formarea de peroxid ciclic, urmată de expansiunea sa, ceea ce duce la apariția radicalilor liberi. Stingerea chimică a  $^1\text{O}_2$  poate duce la consecințe distructive în interiorul celulei. Conform mecanismului fizic, moleculele de diferite compoziții chimice sunt capabile să stingă energia  $^1\text{O}_2$  [124-126].

Compozițiile capabile să stingă stările excitate (majoritatea fiind tripleți) ale pigmentelor și oxigenului singlet au o importanță majoră în eliminarea oxigenului singlet. Printre acestea, carotenoidii sunt cei mai eficienți (de exemplu,  $\beta$ -carotenul), conținând 11 legături duble conjugate. Menținerea excitației



tă, preponderent, de acizii grași saturați, lipide, aminoacizi, nucleotide și alți compuși. Mecanismele de stingere chimică sunt variate, dar în cele mai multe cazuri, etapa inițială o reprezintă formarea unui peroxid ciclic labil, urmat de extinderea acestuia, care duce la apariția de radicali liberi. Stingerea chimică a  $^1\text{O}_2$  poate conduce la consecințe distructive în interiorul celulei. Conform mecanismului fizic, în esență, moleculele diferitor compuși chimici sunt capabile de a stinge energia  $^1\text{O}_2$  [124-126].

O importanță majoră în eliminarea oxigenului singlet o au compușii capabili să stingă stările excitate (în cea mai mare parte, triplete) ale pigmentilor și ale oxigenului singlet. Printre aceștia, cele mai eficiente sunt carotenoidele (de exemplu,  $\beta$ -carotenu) – molecule care conțin 11 legături duble conjugate. Reținând energia de excitare, aceste carotenoide o transformă în căldură, prevenind, astfel, posibilitatea derulării reacțiilor chimice. Acțiunea carotenoizilor este atât de eficientă, încât fiecare coliziune cu tripleții pigmentului excitat sau ai oxigenului singlet, provoacă dezactivarea completă a acestora [126].

Mecanismul acțiunii de protecție a carotenoizilor constă în următoarele: molecula fotosensibilizatorului, absorbind lumina, transferă rapid ( $10^{-11}$  s) energia stării excitate singlet într-un centru de reacție. Din  $10^4$  de fotoni absorbiți, aproximativ 4 duc la transferul moleculei fotosensibilizatorului în starea triplet excitată, fiind posibilă reacția fotodinamică. Carotenoidele pot participa în derularea a trei tipuri de reacții protectoare:

- (1) în mod direct, „stingând” starea triplet a substanței active, aducând-o la starea ei inițială, iar molecula triplet a carotenoidei formate cedează excesul de energie sub formă de căldură și se întoarce la starea sa inițială;
- (2) starea triplet a substanței nu este stinsă de carotenoide, dar are loc interacționarea lor cu oxigenul și transformarea lui într-o stare singlet excitată, după care oxigenul singlet este stins de carotenoide;
- (3) oxigenul singlet, care nu este supus stingerii de către carotenoide prin mecanismul fizic, poate interacționa cu acestea printr-o reacție chimică, din care rezultă oxidarea carotenoidelor [127].

În afară de aceasta, trebuie menționați așa-numiții antioxidanți secundari – enzimele care sunt capabile să detecteze deteriorările oxidative la etapa incipientă și să le înlăture. Astfel, s-a constatat că fosfolipazele recunosc și izolează în mod selectiv acizii grași oxidați din lipidele membranare. Unele enzime proteolitice detectează proteinele ce au deteriorări nesemnificative în rezultatul interacțiunii cu formele active de oxigen și le digeră până la aminoacizi liberi. Apoi, acești aminoacizi pot reveni în metabolismul celular. Unul din mecanismele specifice de protejare de acțiunea oxigenului endogen reprezintă creșterea activității respiratorii a celulelor. În realizarea unei astfel de reacții, se majorează intensitatea transportului de electroni de-a lungul ramurii: citocromii  $b \rightarrow d$ , ce nu este condiționată de stocarea energiei. Astfel, în pofida creșterii activității respiratorii generale, se reduce conjugarea transportului de electroni cu acumularea de energie. Se produce oxidarea unei părți a substraturilor de carbon care sunt utilizați pentru recuperarea oxigenului, fără a acumula energie în celulă [44, 62].

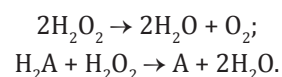
energy, these carotenoids convert it into heat, thus preventing the possibility of chemical reactions to run. The action of carotenoids is so effective that every collision with the excited pigment triplets or singlet oxygen triplets causes their complete deactivation [126].

The mechanism of carotenoid protection consists of the following: photosensitizer molecule, absorbing light, rapidly transfers ( $10^{-11}$ s) the singlet excited state energy to a reaction center. Out of  $10^4$  of all photons of light absorbed, about 4 of them lead to the transfer of photosensitizer molecule to the excited triplet state, the photodynamic reaction being possible. Carotenoids can participate in the evolution of three types of protective reactions:

- (1) quenching directly the active substance triplet state, bringing it to its original state, and the formed carotenoid triplet molecule gives the energy excess as heat and returns to its original state;
- (2) the triplet state of the substance is not quenched by carotenoids, but their interaction with oxygen occurs and its transformation into a singlet excited state, then singlet oxygen is quenched by carotenoids;
- (3) singlet oxygen which is not subject to quench by carotenoids through physical mechanism can interact with them through a chemical reaction resulting in oxidation of carotenoids [127].

In addition, it should be mentioned the so-called secondary antioxidants – enzymes that are capable of detecting oxidative damage at the initial stage and of removing it. Thus, it was found that phospholipases recognize and isolate selectively the oxidized fatty acids in membrane lipids. Some proteolytic enzymes detect proteins that have an insignificant impairment as a result of interaction with active forms of oxygen and digesting them to free amino acids. Then these amino acids may return to the cellular metabolism. One of the specific mechanisms of protection against endogenous oxygen action is the increase of the respiratory activity of cells. In carrying out such a reaction the intensity of electron transport is increased along the branch: cytochromes  $b \rightarrow d$ , which is not conditioned by the energy storage. Thus, despite the increase in overall respiratory activity, the electron transport conjugation is reduced with energy accumulation. Oxidation of a part of the carbon substrates takes place, they being used to recover oxygen without the accumulation of energy in the cell [44, 62].

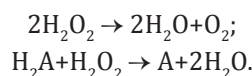
Enzymes are the main form of the cell defense against toxic oxygen derivatives: superoxide dismutase that takes hold of  $\text{O}_2^-$  molecules of catalase and peroxidase that captures  $\text{H}_2\text{O}_2$ :



This contributes to reducing the concentration of  $\text{O}_2^-$  and  $\text{H}_2\text{O}_2$  in the cell and not to their interaction with  $\text{OH}^\cdot$  formation. Superoxide dismutase (superoxide dismutase SOD) is identified in chemotrophic prokaryotes which use oxygen (aerobic and facultative aerobic forms) as well as photosynthetic prokaryotes representatives. In anaerobes this enzyme is found in most air-tolerant forms [62]. Most superoxide dismutases studied are composed of two identical components,



Principala formă de apărare a celulei de acțiunea toxică a derivaților oxigenului sunt enzimele: superoxid dismutaza, care acaparează moleculele de  $O_2$  ale catalazei și peroxidazei, ce capturează  $H_2O_2$ :



Acest fapt contribuie la reducerea concentrației de  $O_2$  și  $H_2O_2$  în celulă și nu la interacționarea lor cu formarea OH $\cdot$ . Superoxid dismutaza este identificată atât în procariotele chemotrofe, care utilizează oxigen (aerobe și formele facultativ aerobe), precum și la reprezentanții procariotelor fotosintetice. Această enzimă a fost depistată la majoritatea formelor aerotolerante de bacterii anaerobe [62]. Majoritatea superoxid dismutazelor studiate sunt constituite din două componente identice, fiecare dintre care conține câte un atom de metal. Ambele forme ale superoxid dismutasei au fost identificate la microorganismele Gram-pozitive și Gram-negative, fototrofe și hemotrofe, la anaerobii obligați, aerobii și formele anaerobe facultative. Mai mult decât atât, cele două metalo-forme ale superoxid dismutazei pot fi prezente într-un organism și chiar să intre în componența moleculei unei enzime. S-a demonstrat că la unele specii, sinteza tipului de enzimă depinde de prezența ionilor metalici în mediul de creștere [62, 127, 128].

Activitatea catalazică și peroxidică a fost identificată la toate procariotele aerobe obligate și facultative. La anaerobii obligați, aceste enzime sunt mai puțin răspândite decât superoxid dismutaza. A fost depistat un șir de anaerobi obligați și aerotoleranți, ce conțin superoxid dismutază, dar care nu conțin catalază. Din acest grup fac parte bacteriile acido-lactice, la care dismutaza ionilor de  $O_2$  formați este asigurată de  $Mn^{2+}$ , prezent în celule în cantități relativ mari. Peroxidul de hidrogen apărut în rezultatul interacțiunii celulelor cu  $O_2$  se elimină și pe căi neenzimatice. Este cunoscut faptul că ionii de  $Fe^{2+}$  în soluție apoasă accelerează reducerea  $H_2O_2$  până la  $H_2O$ . În celulă întotdeauna se conține o anumită cantitate de ioni de fier. Distrugerea  $H_2O_2$  poate avea loc și din cauza substanțelor reduse, eliberate în mediul de cultură [126].

Pentru procariotele anaerobe, este specifică prezența în celule a superoxid dismutazei, iar prezența catalazei nu este obligatorie, deoarece peroxidul de hidrogen, rezultat din reacțiile dismutației și altor reacții, se descompune spontan și organismele, de regula, rezistă în aceste condiții. Astfel, la realizarea metabolismului energetic de tip anaerob, pentru eliminarea efectelor toxice ale  $O_2$ , este necesară doar o singură barieră enzimatică sub formă de superoxid dismutază [73, 93].

## Discuții

Terapia fotodinamică antibacteriană, actualmente, reprezintă o metodă terapeutică adjuvantă în tratamentul gingivitelor, parodontitelor, periimplantitelor, stomatitelor, cheilitelor, cariei dentare și complicațiilor acesteia, și a altor afecțiuni ale cavității orale [110]. Conform cercetărilor efectuate de un șir de autori, în rezultatul efectuării TFD se reduce numărul de bacterii patogene cu 92%-100%, fără a utiliza preparatele antiseptice și antibiotice, care pot provoca reacții adverse [129]. Studiile recente atestă restabilirea echilibrului fiziologic între

each of them containing a metal ion. Both forms of superoxide dismutases were identified in Gram-positive and Gram-negative microorganisms, phototrophic and hemotrophic, obligate anaerobic, aerobic and facultative anaerobic forms of microorganisms. Moreover, the two metal forms of superoxide dismutase can be present in an organism and even become part of an enzyme molecule. It has been shown that enzyme-type synthesis in some species is based on the presence of metal ions in the growth medium [62, 127, 128].

Peroxide and catalase activity was identified in all obligate and facultative aerobic prokaryotes. In obligate anaerobes these enzymes are uncommon compared to superoxide dismutase. It was discovered a number of severe and air-tolerant anaerobes containing superoxide dismutase, but they do not contain catalase. This group includes acid-lactic bacteria, in which dismutase of formed  $O_2$  - ions is provided by  $Mn^{2+}$  located in the cells in high concentrations. Hydrogen peroxide occurring after interaction between the cell and  $O_2$ , is eliminated through non-enzymatic pathways as well. It is known that  $Fe^{2+}$  ions in aqueous solution, accelerates the reduction of  $H_2O_2$  to  $H_2O$ . The cell always contains a certain amount of iron ions.  $H_2O_2$  destruction can occur because of reduced substances released into the culture medium [126].

The presence of superoxide dismutase in the cell is specific for anaerobic prokaryotes, while the presence of catalase is not required, because hydrogen peroxide resulting from dismutase reactions and other reactions decomposes spontaneously and generally organisms withstand in these conditions. Thus, only one enzyme barrier is required (that being superoxide dismutase) to carry out the anaerobic energy metabolism to eliminate the toxic effects of  $O_2$  [73, 93].

## Discussions

Antibacterial photodynamic therapy is currently an adjunctive therapeutic method in the treatment of gingivitis, periodontitis, peri-implantitis, stomatitis, cheilitis, dental caries and its complications and other diseases of the oral cavity [110]. According to researches conducted by a number of authors, the number of pathogenic bacteria is decreased by 92%-100% as a result of PDT, without using antiseptic and antibiotic medications which can cause side effects [129]. Latest studies attest restoration of the physiological balance between aerobic and anaerobic microflora of the mouth after performing PDT, in a ratio of 75%:25% [4, 130].

Researches carried out by a number of authors found that bactericidal effect of photodynamic therapy on the oral cavity microflora depends on the type or PS concentration, laser irradiation parameters or LED used, location conditions and form of organization of microorganisms. In just a 24 hour period after having performed photodynamic therapy the number of pathogens reduced 10 times [131-142]. Today, a wide variety of PS used in PDT of diseases of the oral cavity (toluidine blue, methylene blue, radochlorine, photolon, photodithazine etc.) are known. They showed to be effective in suppressing both Gram-positive and Gram-negative bacteria [136, 137]. Studies in vitro, experimental and clinical studies have shown that af-

microflora aeobă și cea anaerobă a cavității bucale după efectuarea TFD, într-un raport de 75%:25% [4, 130].

S-a constatat că efectul bactericid al terapiei fotodinamice asupra microflorei cavității orale este în funcție de tipul sau concentrația FS, parametrii iradierii laserului sau LED-ului utilizat, condițiile de localizare și forma de organizare a microorganismelor. Într-o perioadă de numai 24 de ore după efectuarea terapiei fotodinamice, s-a redus de 10 ori numărul de microorganisme patogene [131-142]. La ora actuală, este cunoscută o varietate largă de FS (albastru de toluidină; albastru de metilen, radoclorin, fotolon, fotodithazină ș.a.) utilizați în TFD afecțiunilor cavității orale, care s-au dovedit a fi eficienți în suprimarea atât a bacteriilor Gram-pozitive, cât și a celor Gram-negative [137-136]. Studiile *in vitro* au demonstrat că în rezultatul PDT sunt distruse eficient și total microorganismele din biofilmul oral care provoacă afecțiunile parodontiului, caria dentară și alte maladii stomatologice [131, 132, 143-145].

O sensibilitate sporită la TFD a fost depistată la enterobacterii (54% din cazuri), streptococii non-hemolitici (45% din cazuri) și la fungi. Așadar, terapia fotodinamică exercită un efect antibacterian asupra bacteriilor Gram-pozitive, Gram-negative și fungi, în egală măsură provocând distrugerea microorganismelor aerobe, a celor facultativ-anaerobe și a celor anaerobe [131, 144-146].

Pentru a obține rezultate optime după utilizarea TFD, este important de a lua în considerație condițiile de aplicare a fotosensibilizatorilor: tipul celulei cu care se va lega FS, concentrația la care FS manifestă eficiență maximă, lungimea de undă și intensitatea iradierii laser sau LED, necesare pentru activarea fotosensibilizatorului, solubilitatea FS în lichidele și lipidele înconjurătoare și gradul de ionizare a FS.

Avantajul aplicării TFD constă în posibilitatea anihilării strict localizate a celulelor bacteriene amplasate atât la suprafață, cât și în spațiile intercelulare, fără survenirea unor reacții adverse asupra zonelor adiacente [147]. Un avantaj incontestabil al terapiei fotodinamice antimicrobiene (TFDA) vis-a-vis de antibioticoterapie, este caracterul multiplu al distrugerii oxidative a celulelor-țintă microbiene, care previne formarea rezistenței la curele ulterioare de TFD [82].

În plan sintetic, au fost identificate zece avantaje ale terapiei fotodinamice antimicrobiene în tratamentul afecțiunilor cavității orale, provocate de biofilme, comparativ cu terapia antibacteriană convențională:

- (1) eficiența TFDA nu este influențată de sensibilitatea microorganismelor patogene la preparatele antibacteriene. Prin TFDA sunt distruse tulpinile microbiene antibiotice rezistente și biofilmele bacteriene;
- (2) eliminarea bacteriilor are loc foarte rapid, în câteva minute sau chiar secunde;
- (3) TFDA are un spectru larg de acțiune asupra tuturor agenților patogeni microbieni;
- (4) în rezultatul efectuării TFD, se reduce numărul de bacterii patogene cu 92%-100%;
- (5) după efectuarea TFD, se atestă restabilirea echilibrului fiziologic între microflora aeobă și cea anaerobă a cavității bucale;
- (6) este exclusă posibilitatea dezvoltării tulpinilor microbiene rezistente;

ter using PDT, microorganisms in the oral biofilm that cause periodontal disease, tooth decay and other dental diseases are effectively and completely destroyed [131, 132, 143-145].

An increased sensitivity to PDT was detected in enterobacteria (54% of cases), non-hemolytic streptococci (45% of cases) and fungi. Thus, photodynamic therapy exerts an antibacterial effect on Gram-positive bacteria, Gram-negative bacteria and fungi, equally causing the destruction of aerobic, anaerobic and facultative anaerobic microorganisms as well as anaerobic ones [131, 144-146].

In order to obtain the best results after PDT, it is important to take into account the conditions of application of photosensitizers: cell type to which PS binds, concentration at which PS exhibits maximum efficiency, wavelength and intensity of LED or laser irradiation necessary to activate the photosensitizer, PS solubility in fluids and surrounding lipids, and degree of PS ionization.

The advantage of applying PDT is the possibility of strictly localized annihilation of bacterial cells located both at the surface and in intercellular spaces without any adverse effects on adjacent areas [147]. An undeniable advantage of antimicrobial photodynamic therapy versus antibiotic therapy is multiple character of oxidative damage to target microbial cells, which prevents development of resistance to subsequent PDT sessions [82].

Thus, after analyzing literature sources, we highlighted the following advantages of applying antimicrobial photodynamic therapy in treatment of diseases of the oral cavity caused by biofilms in relation to application of antibacterial therapy:

- (1) APDT efficiency is not affected by sensitivity of pathogenic microorganisms to antibacterial preparations. Microbial strains and bacterial biofilms which exhibit antibiotic resistance are destroyed by APDT;
- (2) bacteria is eliminated very quickly, within minutes or even seconds;
- (3) APDT has a broad spectrum of activity against all microbial pathogens;
- (4) as a result of PDT application the number of pathogenic bacteria is reduced by 92%-100%;
- (5) physiological balance between oral aerobic and anaerobic microflora after PDT is restored;
- (6) the possibility of developing resistant microbial strains is excluded;
- (7) photosensitive substances applied in APDT do not exert cytotoxic activity without photoactivation, and do not exert mutagenic action, thus the probability of selecting resistant microbial strains is excluded;
- (8) antibacterial effect of APDT is not reduced over time, in case of repeated sessions;
- (9) bactericidal action of APDT is local and adjacent tissues are not affected;
- (10) APDT does not exert any harmful effect on saprophytic flora of the whole body, because no component of APDT exerts any systemic bactericidal effect or other destructive (cytotoxic or toxic) effects at macrolevel.

- (7) substanțele fotosensibile, utilizate în TFDA, nu exercită acțiune citotoxică fără fotoactivare, nu exercită acțiune mutagenă, fapt care exclude probabilitatea selectării tulpinilor microbiene rezistente;
- (8) efectul antibacterian al TFDA nu se reduce în timp, în cazul aplicării ședințelor repetate;
- (9) acțiunea bactericidă a TFDA are un caracter local și țesuturile adiacente nu sunt afectate;
- (10) TFDA nu exercită efect nociv asupra florei saprofite a întregului organism, datorită faptului că niciun component al TFDA nu exercită efect bactericid sistemic sau alte efecte distructive (citotoxic sau toxic) la nivel de macroorganism.

### Concluzii

Aplicarea terapiei fotodinamice antimicrobiene în tratamentul maladiilor provocate de biofilme se datorează unui 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. TFDA este o metodă de tratament care oferă numeroase avantaje: este o tehnică non-invazivă, fără sângerare, fără necesitatea aplicării anesteziei locale, poate fi aplicată în condiții de ambulator, poate fi repetată, neavând toxicitate cumulativă și timp de vindecare scurt. Este important de menționat faptul că în rezultatul terapiei fotodinamice sunt afectate numai celulele sensibilizate și nu sunt afectate țesuturile înconjurătoare.

Astfel, în viitorul apropiat, terapia fotodinamică poate deveni o alternativă eficientă a metodelor antibacteriene, tradiționale, de tratament.

### Declarația de conflict de interese

Nimic de declarat.

### Referințe / references

1. Kostakioti M., Hadjifrangiskou M., Hultgren S. Bacterial Biofilms: development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2013; 3(4): a010306. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3683961>.
2. Short F., Murdoch S., Ryan R. Polybacterial human disease: the ills of social networking. *Trends in Microbiology*, 2014; 22(9): 508-516. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4158425>.
3. Falsetta M., Klein M., Colonne P. *et al.* Symbiotic relationship between *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* synergizes virulence of plaque biofilms *in vivo*. *Infection and Immunity*, 2014; 82(5): 1968-1981. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3993459>.
4. Fontana C., Abernethy A., Som S. *et al.* The antibacterial effect of photodynamic therapy in dental plaque-derived biofilms. *Journal of Periodontal Research*, 2009; 44(6): 751-759. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2784141>.
5. Drlica K. Antibiotic resistance: can we beat the bugs? *Drug Discov Today*, 2001; 6: 714-715. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11445459?dopt=Abstract>.
6. Cunha B. Antibiotic resistance. Control strategies. *Crit. Care*

### Conclusions

Application of anti-microbial photodynamic therapy in the treatment of diseases caused by biofilms is due to a process of interaction between the active forms of oxygen and the toxic radicals with anti-stress factors of the bacteria and its effect can be different depending on the intensity of the generation of active forms of oxygen, the activity of antistress proteins, bacterial antioxidant enzymes and many other factors. APDT is a therapeutic method that has numerous advantages: it is a non-invasive technique; there is no bleeding; there is no need for application of local anesthetic; it may be applied on an out-patient basis; it can be repeated; it has no cumulative toxicity; it requires short recovery time. It is important to note that as a result of photodynamic therapy only sensitized cells are affected while the surrounding tissues are not affected.

Thus, in the near future, photodynamic therapy can become an effective and progressive alternative to traditional antibacterial treatment methods.

### Declaration of conflicting interests

Nothing to declare.

- Clin*, 1998; 14: 309-327. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9561819>.
7. Cassell G., Mekalanos J. Development of antimicrobial agents in the era of new and reemerging infectious diseases and increasing antibiotic resistance. *JAMA*, 2001; 285: 601-605. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11176866>.
8. Maisch T. A new strategy to destroy antibiotic resistant microorganisms: antimicrobial photodynamic treatment. *Mini Rev Med Chem*, 2009; 9(8): 974-83. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19601890>.
9. Bell S. Antibiotic resistance: is the end of an era near? *Neonatal Netw*, 2003; 22: 47-54. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14700181>.
10. Bush K., Courvalin P., Dantas G., Davies J., Eisenstein B., Huovinen P., Jacoby G., Kishony R., Kreiswirth B., Kutter E. Tackling antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol*, 2011; 9: 894-896. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4206945>.
11. Yoshikawa T. Antimicrobial resistance and aging: beginning of the end of the antibiotic era? *J Am Geriatr Soc*, 2002; 50: 226-229. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12121517>.
12. Ehrlich P. Chemotherapeutic: scientific principles, methods and results. *Lancet*, 1913; 182 (4694): 445-451. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673601387056>.



13. Cervený K., DePaola A., Duckworth D., Gulig P. Phage therapy of local and systemic disease caused by *Vibrio vulnificus* in iron-dextran-treated mice. *Infect Immun*, 2002; 70: 6251-62. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC130292>.
14. Sajjan U., Tran L., Sole N. *et al.* P-113D, an antimicrobial peptide active against *Pseudomonas aeruginosa*, retains activity in the presence of sputum from cystic fibrosis patients. *Antimicrob Agents Chemother*, 2001; 45: 3437-3444. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC90850>.
15. Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) *J Antimicrob Chemother*, 1998; 42: 13-28. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9700525>.
16. Ichinose-Tsuno, A., Aoki A., Takeuchi Y. *et al.* Antimicrobial photodynamic therapy suppresses dental plaque formation in healthy adults: a randomized controlled clinical trial. *BMC Oral Health*, 2014; 14(1): 152-162. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4289549>.
17. Lupan I., Spinei A., Spinei I. Dental status of children in the Republic of Moldova. *BaSS 2011. 16<sup>th</sup> Congress of the Balkan Stomatological Society*. Bucharest, Romania, 2011: 202-203.
18. PubMed [Internet]. US National Library of Medicine. „PubMed.gov”. Disponibil la adresa: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=antimicrobial+photodynamic+therapy+in+dentistry> Accesat pe: 08.02.2015.
19. Dougherty T., Gomer C., Henderson B., Jori G., Kessel D., Korbek M., Moan J., Peng Q. Photodynamic therapy. *J Natl Cancer Inst*, 1998; 12(90): 889-905. <http://jnci.oxfordjournals.org/content/90/12/889.full>.
20. Henderson B., Dougherty T. How does photodynamic therapy work? *Photochem Photobiol*, 1992; 1(55):145-157. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1751-1097.1992.tb04222.x/pdf>.
21. James S., McCaughan Jr. Photodynamic therapy: a review. *Drugs Aging*, 1999; 1(15):49-68. <http://link.springer.com/article/10.2165%2F00002512-199915010-00005>.
22. Dolmans D., Fukumura D., Jain R. Photodynamic therapy for cancer. *Nat Rev Cancer*, 2003; 3(5): 380-387. <http://www.nature.com/nrc/journal/v3/n5/full/nrc1071.html>.
23. Hamblin M., Hasan T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem Photobiol Sci*, 2004; 5: 436-450. <http://pubs.rsc.org/en/Content/ArticleLanding/2004/PP/b311900a#!divAbstract>.
24. Phillips D. Light relief: photochemistry and medicine. *Photochem Photobiol Sci*, 2010; 9: 1589-96. <http://pubs.rsc.org/en/Content/ArticleLanding/2010/PP/c0pp00237b#!divAbstract>.
25. Brancalion L., Moseley H. Laser and non-laser light sources for photodynamic therapy. *Lasers Med Sci*, 2002; 17(3): 173-86. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12181632>.
26. Pervaiz S. Reactive oxygen-dependent production of novel photochemotherapeutic agents. *FASEB J*, 2001; 15(3): 612-617. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11259379>.
27. Bergamini C., Gambetti S., Dondi A., Cervellati C. Oxygen, reactive oxygen species and tissue damage. *Curr Pharm Des*, 2004; 10: 1611-1626. <http://www.eurekaselect.com/62681/article>.
28. Sharman W., Allen C., van Lier J. Role of activated oxygen species in photodynamic therapy. *Methods Enzymol*, 2000; 319: 376-400. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0076687900190378>.
29. Castano A., Demidova T., Hamblin M. Mechanisms in photodynamic therapy: part one – photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagn Photodyn Ther*, 2004; 1: 279-293. [http://www.pdpdt-journal.com/article/S1572-1000\(05\)00007-4/abstract](http://www.pdpdt-journal.com/article/S1572-1000(05)00007-4/abstract).
30. Pervaiz S., Olivo M. Art and science of photodynamic therapy. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2006; 5-6 (33):551-556. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1440-1681.2006.04406.x/full>.
31. Sibata C., Colussi V., Oleinick N., Kinsella T. Photodynamic therapy: a new concept in medical treatment. *Braz J Med Biol Res*, 2000; 33: 869-880. [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-879X200000800002&lng=en&nrm=iso&tlng=e](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-879X200000800002&lng=en&nrm=iso&tlng=e).
32. Zorov B., Juhaszova M., Sollott S. Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS) and ROS-induced ROS Release. *Physiological Reviews Published*, 2014; 3(94): 909-950. <http://physrev.physiology.org/content/94/3/909>.
33. Vermeersch G., Ronfard-Haret J., Bazin M., Carillet V., Morliere P., Santus R. Type I and type II photosensitization by the antibacterial drug nalidixic acid. A laser flash photolysis study. *Photochem Photobiol*, 1991; 54: 661-666.
34. Foote C. Definition of type I and type II photosensitized oxidation. *Photochem Photobiol* 1991; 54: 659. [http://www.readcube.com/articles/10.1111%2Fj.1751-1097.1991.tb02071.x?r3\\_referer=wol&tracking\\_action=preview\\_click&show\\_checkout=1](http://www.readcube.com/articles/10.1111%2Fj.1751-1097.1991.tb02071.x?r3_referer=wol&tracking_action=preview_click&show_checkout=1).
35. Strakhovskaya M., Shumarina A., Fraikin G., Rubin A. Synthesis of protoporphyrin IX induced by 5-aminolevulinic acid in yeast cells in the presence of 2,2'-dipyridyl. *Biokhimiya (Moscow)*, 1998;63: 725-728. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9668214>.
36. Strakhovskaya M., Ivanova E., Kolesnikova O., Fraikin G. Effect of 2,2'-dipyridyl on accumulation of protoporphyrin IX and its derivatives in yeast mitochondria and plasma membranes. *Biokhimiya (Moscow)*, 1999; 64: 213-216. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10187915>.
37. Strakhovskaya M., Shumarina A., Fraikin G., Rubin A. Endogenous porphyrin accumulation and photosensitization in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of 2,2'-dipyridyl. *J Photochem Photobiol B*, 1999; 49: 18-22. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10365443>.
38. Sakamoto F., Doukas A., Farinelli W., Tannous Z., Su Y., Smith N., Zurakowski D., Anderson R. Intracutaneous ALA photodynamic therapy: dose-dependent targeting of skin structures. *Lasers Surg Med*, 2011; 43(7): 621-631. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22057490>.
39. Alves E., Faustino M., Neves M., Cunha A., Tome J., Almeida A. An insight on bacterial cellular targets of photodynamic inactivation. *Future Med Chem*, 2014; 6(2): 141-164. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24467241>.
40. Banfi S., Caruso E., Buccafurni L. *et al.* Antibacterial activity of tetraaryl-porphyrin photosensitizers: an in vitro study on Gram negative and Gram positive bacteria. *J Photochem Photobiol B*, 2006; 85(1): 28-38. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16737820>.
41. Komerik N., Wilson M., Poole S. The effect of photodynamic action on two virulence factors of gram-negative bacteria. *Photochem Photobiol*, 2000; 72: 676-680. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11107854>.
42. Pereira M., Faustino M., Tomé J. *et al.* Influence of external bacterial structures on the efficiency of photodynamic inactivation by a cationic porphyrin. *Photochem Photobiol Sci*, 2014; 13: 680-690. <http://pubs.rsc.org/en/Content/ArticleLanding/2014/PP/c3pp50408e#!divAbstract>.
43. Usacheva M., Teichert M., Biel M. Comparison of the methyle-



- ne blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against gram-positive and gram-negative microorganisms. *Lasers Surg Med*, 2001; 29(2): 165-173. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11553906>.
44. Vladimirov Y, Olenev V, Suslova T, Cheremisina Z. Lipid peroxidation in mitochondrial membranes. *Adv Lipid Res*, 1980; 17: 173-249. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6992527>.
45. Nitzan Y, Gutterman M, Malik Z, Ehrenberg B. Inactivation of gram-negative bacteria by photosensitized porphyrins. *Photochem Photobiol*, 1992; 55: 89-96. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1534909>.
46. Ozkan E, Allan E, Parkin I. The antibacterial properties of light-activated polydimethylsiloxane containing crystal violet. *RSC Adv*, 2014; 4: 51711-51715. <http://pubs.rsc.org/en/Content/ArticleLanding/2014/RA/C4RA08503E#!divAbstract>.
47. Redmond R, Gamlin J. A compilation of singlet oxygen yields from biologically relevant molecules. *Photochem Photobiol*, 1999; 70: 391-475. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1751-1097.1999.tb08240.x/abstract>.
48. Boegheim J, Dubbelman T, Mullenders L, Steveninck J. Photodynamic effects of haematoporphyrin derivative on DNA repair in murine L929 fibroblasts. *Biochem J*, 1987; 244(3): 711-715. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1148054>.
49. Moan J, Waksvik H, Christensen T. DNA single-strand breaks and sister chromatid exchanges induced by treatment with hematoporphyrin and light or by x-rays in human NHK 3025 cells. *Cancer Res*, 1980; 40(8 Pt1): 2915-18. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubme>.
50. Moan J, Boye E. Photodynamic effect on DNA and cell survival of human cells sensitized by hematoporphyrin. *Photobiophys*, 1981; 2: 301-307.
51. Moan J, Kvam E, Hovig E, Berg K. Effects of PDT on DNA and Chromosomes. *Photobiology*, 1991: 821-829. [http://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-1-4615-3732-8\\_89](http://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-1-4615-3732-8_89).
52. El-Hussein A, Harith M, Abrahamse H. Assessment of DNA damage after photodynamic therapy using a metallophthalocyanine photosensitizer. *International Journal of Photoenergy*, 2012; Article ID 281068, 10 pages. <http://www.hindawi.com/journals/ijp/2012/281>.
53. Fonseca A, Moreira T, Paixão D, Farias F, Guimarães O, Paoli S, Geller M, Paoli F. Effect of laser therapy on DNA damage. *Lasers in Surgery and Medicine*, 2010; 42(6): 481-488.
54. Kota S, Charaka V, Ringgaard S, Waldor M, Misra H. PprA contributes to *Deinococcus radiodurans* resistance to nalidixic acid, genome maintenance after DNA damage and interacts with deinococcal topoisomerases. *PLoS ONE*, 2014; 9(1): e85288. doi:10.1371/journal.pone.0085288. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3893189>.
55. Tavares A, Carvalho C, Faustino M. *et al.* Antimicrobial photodynamic therapy: study of bacterial recovery viability and potential development of resistance after treatment. *Mar Drugs*, 2010; 8: 91-105. [www.mdpi.com/journal/marinedrugs](http://www.mdpi.com/journal/marinedrugs).
56. Bertoloni G, Lauro F, Cortella G, Merchat M. Photosensitizing activity of hematoporphyrin on *Staphylococcus aureus* cells. *Biochim Biophys Acta*, 2000; 1475: 169-174. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10832032>.
57. Menezes S, Capella M, Caldas L. Photodynamic action of methylene blue: repair and mutation in *Escherichia coli*. *J Photochem Photobiol B*, 1990; 5: 505-517. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2142960>.
58. Capella M, Coelho A.M., Menezes S. Effect of glucose on photodynamic action of methylene blue in *Escherichia coli* cells. *Photochem Photobiol*, 1996; 64: 205-210. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8787015>.
59. Tuchin V, Genina E, Bashkatov A, Simonenko G, Odoevskaya O, Altshuler G. A pilot study of ICG laser therapy of acne vulgaris: photodynamic and photothermolysis treatment. *Lasers in surgery and medicine*, 2003; 33(5): 296-310. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/lsm.10211/abstract>.
60. Mroz P, Tegos G, Gali H, Wharton T, Sarna T, Hamblin M. Photodynamic therapy with fullerenes. *Photochem Photobiol Sci*, 2007; 6: 1139-1149. <http://pubs.rsc.org/en/Content/ArticleLanding/2007/PP/b711141j#!divAbstract>.
61. van Duijnhoven F, Aalbers R, Rovers J, Terpstra O, Kuppen P. The immunological consequences of photodynamic treatment of cancer, a literature review. *Immunobiology*, 2003; 207(2): 105-113. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12675268>.
62. Krasnovsky A, Drozdova N, Ivanov A, Ambartsumian R. Activation of molecular oxygen by infrared laser radiation in pigment-free aerobic systems. *Biochem (Moscow)*, 2003; 68: 963-966. <http://link.springer.com/article/10.1023%2FA%3A1026052310563>.
63. Antunes F, Salvador A, Marinho H, Alves R, Pinto R. Lipid peroxidation in mitochondrial inner membranes. I. An integrative kinetic model. *Free Radic Biol Med*, 1996; 21(7): 917-943. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8937879>.
64. Vassiliev N, Ogirenko A. Antimicrobial photodynamic therapy. *Laser medicine*, 2002; 6(1): 32-38. <http://www.atcus.ru/upload/failed/public/publik%20until%202008/6%281%29%2032.pdf>.
65. Hongcharu W, Taylor C, Chang Y. *et al.* Topical ALA-photodynamic therapy for the treatment of *acne vulgaris*. *J Invest Dermatol*, 2000; 115: 183-92. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10951234>.
66. Malik Z, Hanania J, Nitzan Y. Bactericidal effects of photoactivated porphyrins – an alternative approach to antimicrobial drugs. *J Photochem Photobiol B*, 1990; 5: 281-293. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2115912>.
67. Malik Z, Hanania J, Nitzan Y. New trends in photobiology bactericidal effects of photoactivated porphyrins – an alternative approach to antimicrobial drugs. *J Photochem Photobiol B*, 1990; 5(3-4): 281-294. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/211591>.
68. Shah H, Bonnett R, Mateen B. *et al.* The porphyrin pigmentation of subspecies of *Bacteroides melaninogenicus*. *Biochemical Journal*, 1979; 180(1): 45-50. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/39545>.
69. Asimov M. The biomedical effect of laser-induced photodissociation of oxyhemoglobin *in vivo*. *Optics and Spectroscopy*, 2013, 115(5): 774-778. <http://link.springer.com/article/10.1134%2FS0030400X13110027>.
70. Shah H, Williams R, Bowden G, Hardie J. Comparison of the biochemical properties of *Bacteroides melaninogenicus* from human dental plaque and other sites. *J Appl Bacteriol*, 1976; 41(3): 473-495. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14095>.
71. Moan J, Streckyte G, Bagdonas S, Bech O, Berg K. Photobleaching of protoporphyrin IX in cells incubated with 5-aminolevulinic acid. *Int J Cancer*, 1997; 70: 90-97. [http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)1097-0215\(19970106\)70:1%3C90::AID-IJC14%3E3.0.CO;2-H/abstract](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1097-0215(19970106)70:1%3C90::AID-IJC14%3E3.0.CO;2-H/abstract).
72. Feuerstein O, Ginsburg I, Dayan E, Veler D, Weiss E. Mechanism of visible light phototoxicity on *Porphyromonas gingivalis*. *Photochemistry and Photobiology*, 2005; 81(5): 1186-1189. <http://www.bioone.org/doi/abs/10.1562/2005-04-06-RA-477>.

73. Moan J. On the diffusion length of singlet oxygen in cells and tissues. *J Photochem Photobiol B*, 1990; 6(3): 343-344. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/1011134490851045>.
74. Niedre M., Patterson M., Wilson B. Direct near-infrared luminescence detection of singlet oxygen generated by photodynamic therapy in cells in vitro and tissues in vivo. *Photochem Photobiol*, 2002; 75(4): 382-391. [http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1562/0031-8655\(2002\)0750382DNILD02.0.CO2;abstract](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1562/0031-8655(2002)0750382DNILD02.0.CO2;abstract).
75. Bilski P., Li M., Ehrenshaft M., Daub M., Chignell C. Vitamin B6 (pyridoxine) and its derivatives are effective singlet oxygen quenchers and potential fungal antioxidants. *Photochem Photobiol*, 2000; 71: 129-134. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10687384>.
76. Fomichev A., Chudoba V., Egorova I. *et al.* Isovector soft dipole mode in 6Be. *Physics Letters B*, 2012; 708: 6-13 [http://ac.elsa-cdn.com/S0370269312000068/1-s2.0-S0370269312000068-main.pdf?\\_tid=43eee77e-af5e-11e4-b872-00000aab0f6b&acdnat=1423378193\\_e7d-76312691c5e289b57dc75367020e7](http://ac.elsa-cdn.com/S0370269312000068/1-s2.0-S0370269312000068-main.pdf?_tid=43eee77e-af5e-11e4-b872-00000aab0f6b&acdnat=1423378193_e7d-76312691c5e289b57dc75367020e7).
77. Schneider J., Phillips J., Pye Q., Maitt M., Price S., Floyd R. Methylene blue and rose bengal photoinactivation of RNA bacteriophages: comparative studies of 8-oxoguanine formation in isolated RNA. *Arch Biochem Biophys*, 1993; 301: 91-97. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8382909>.
78. Schneider J., Pye Q., Floyd R. Q beta bacteriophage photoinactivated by methylene blue plus light involves inactivation of its genomic RNA. *Photochem Photobiol*, 1999; 70(6): 902-909. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10628301>.
79. Szocs K., Gabor F., Csik G., Fidy J.  $\delta$ -Aminolaevulinic acid-induced porphyrin synthesis and photodynamic inactivation of *Escherichia coli*. *J Photochem Photobiol B*, 1999; 50:8-17.
80. Fotinos N., Convert M., Piffaretti J., Gurny R., Lange N. Effects on Gram-negative and Gram-positive bacteria mediated by 5-aminolevulinic acid and 5-aminolevulinic acid derivatives. *Antimicrob Agents Chemother*, 2008; 52(4): 1366-1373. <http://aac.asm.org/content/52/4/1366.full>.
81. Malik R., Manocha A., Suresh D. Photodynamic therapy - a strategic review. *Indian J Dent Res*, 2010; 21(2): 285-291. <http://www.ijdr.in/article.asp?issn=0970-9290;year=2010;volume=21;issue=2;spage=285;epage=291;aulast=Malik>.
82. Jori G., Brown S. Photosensitized inactivation of microorganisms. *Photochem Photobiol Sci*, 2004; 3: 403-405. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15122355>.
83. Jori G., Fabris C., Soncin M., Ferro S., Coppellotti O., Dei D. *et al.* Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. *Lasers Surg Med*, 2006; 38: 468-481. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16788934>.
84. Dahl T., Midden W., Hartman P. Comparison of killing of gram-negative and gram-positive bacteria by pure singlet oxygen. *J Bacteriol*, 1989; 171(4): 2188-2194. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC209876>.
85. Dougherty T. An update on photodynamic therapy applications. *J Clin Laser Med Surg*, 2002; 20: 3. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11902352>.
86. Soukos N., Hamblin M., Hasan T. The effect of charge on cellular uptake and phototoxicity of polylysine chlorin e6 conjugates. *Photochem Photobiol*, 1997; 65: 723-729. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9114750>.
87. Rovaldi C., Pievsky A., Sole N., Friden P., Rothstein D., Spacciapoli P. Photoactive porphyrin derivative with broad-spectrum activity against oral pathogens *in vitro*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000; 44: 3364-3367. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
88. Polo L., Segalla A., Bertoloni G., Jori G., Schaffner K., Reddi E. Polylysine-porphycene conjugates as efficient photosensitizers for the inactivation of microbial pathogens. *J Photochem Photobiol B*, 2000; 59: 152-158. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11332884>.
89. Lauro F., Pretto P., Covolo L., Jori G., Bertoloni G. Photoinactivation of bacterial strains involved in periodontal diseases sensitized by porphycene-polylysine conjugates. *Photochem Photobiol Sci*, 2002; 1: 468-470. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12659156>.
90. Hamblin M., O'Donnell D., Murthy N. *et al.* Polycationic photosensitizer conjugates: effects of chain length and Gram classification on the photodynamic inactivation of bacteria. *J Antimicrob Chemother*, 2002; 49: 941-951. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12039886>.
91. Demidova T., Hamblin M. Macrophage-targeted photodynamic therapy. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2004; 17: 117. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3071048>.
92. Kochevar I. Singlet oxygen signaling: from intimate to global. *Sci STKE*, 2004: 221. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14983102>.
93. Moan J., Berg K. The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen. *Photochem Photobiol*, 1991; 53(4): 549-553. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1751-1097.1991.tb03669.x/abstract>.
94. Bonnett R., Martinez G. Photobleaching of sensitizers used in photodynamic therapy. *Tetrahedron*, 2001; 57(47): 9513-9574. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0040402001009528>.
95. Bagdonas S., Ma L., Iani V., Rotomskis R., Juzenas P., Moan J. Phototransformations of 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX *in vitro*: a spectroscopic study. *Photochem Photobiol*, 2000; 72(2): 186-192. <http://www.bioone.org/doi/abs/10.1562/0031-8655%282000%29072%3C0186%3APOA AIP%3E2.0.CO%3B2>.
96. Ericson M., Grapengiesser S., Gudmundson F., Wennberg A., Laroko O., Moan J., Rosen A. A spectroscopic study of the photobleaching of protoporphyrin IX in solution. *Lasers Med Sci*, 2003; 18(1): 56-62. <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10103-002-0254-2>.
97. Kessel D. Relocalization of cationic porphyrins during photodynamic therapy. *Photochem Photobiol Sci*, 2002; 1(11): 837-840. <http://pubs.rsc.org/en/Content/ArticleLanding/2002/PP/b206046a#!divAbstract>.
98. Ruck A., Beck G., Bachor R. *et al.* Dynamic fluorescence changes during photodynamic therapy in vivo and in vitro of hydrophilic A1(III) phthalocyanine tetrasulphonate and lipophilic Zn(II) phthalocyanine administered in liposomes. *J Photochem Photobiol B*, 1996; 36(2): 127-133. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1011134496073599>.
99. Schafer M., Schmitz C., Facius R. *et al.* Systematic study of parameters influencing the action of Rose Bengal with visible light on bacterial cells: comparison between the biological effect and singlet-oxygen production. *Photochem Photobiol*, 2000; 71: 514-523. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10818781>.
100. Abels C. Targeting of the vascular system of solid tumours by photodynamic therapy (PDT). *Photochem Photobiol Sci*, 2004; 3: 765-771. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?filters=&orig\\_db=PubMed&cmd=Search&term=Photochem%20Photobi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?filters=&orig_db=PubMed&cmd=Search&term=Photochem%20Photobi)

- ol%20Sci%5Bjour%5D%20AND%203%5Bvolume%5D%20AND%20765%5Bpage%5D.
101. Wilson M., Dobson J., Harvey W. Sensitization of oral bacteria to killing by low-power laser radiation. *Curr Microbiol*, 1992; 25(2): 77-81. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1369193>.
  102. Wilson M., Burns T., Prarten J. Killing of *Streptococcus sanguis* in biofilms using a light-activated antimicrobial agent. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 1996; 37: 377-381. <http://jac.oxfordjournals.org/content/37/2/377.full.pdf>.
  103. Wilson M., Mia N. Sensitisation of *Candida albicans* to killing by low-power laser light. *J Oral Pathol Med*, 1993; 22(8): 354-357. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7506775>.
  104. Araghizaden A., Fani M., Kohanteb Y., Khojastehpour L. Antibacterial effects of Ga-As laser with toluiden blue on oral microorganism. *Medical Journal of Hormozgan University*, 2005; 9(2): 119-124. <http://en.journals.sid.ir/ViewPaper.aspx?ID=73563>.
  105. Millson C., Thurrell W., Buonaccorsi G. *et al.* The effect of low-power laser light at different doses on gastric mucosa sensitized with methylene blue, haematoporphyrin derivative or toluidine blue. *Lasers in Medical Science*, 1997; 12(2): 145-150. <http://link.springer.com/article/10.1007%2FBF02763984>.
  106. Zeina B., Greenman J., Purcell W., Das B. Killing of cutaneous microbial species by photodynamic therapy. *Br J Dermatol*, 2001; 144(2): 274-278. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11251558>.
  107. Peloi L., Soares R., Biondo C., Souza V., Hioka N., Kimura E. Photodynamic effect of light-emitting diode light on cell growth inhibition induced by methylene blue. *Journal of Biosciences*, 2008; 33(2): 231-237. [http://www.researchgate.net/publication/5320946\\_Photodynamic\\_effect\\_of\\_light-emitting\\_diode\\_light\\_on\\_cell\\_growth\\_inhibition\\_induced\\_by\\_methylene\\_blue](http://www.researchgate.net/publication/5320946_Photodynamic_effect_of_light-emitting_diode_light_on_cell_growth_inhibition_induced_by_methylene_blue).
  108. Usacheva M., Teichert M., Biel M. The interaction of lipopolysaccharides with phenothiazine dyes. *Lasers Surg Med*. 2003; 33(5): 311-319. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14677158>.
  109. Sperandio F., Huang Y., Hamblin M. Antimicrobial photodynamic therapy to kill Gram-negative bacteria. *Recent Pat Antinfect Drug Discov*, 2013; 8(2): 108-120. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3740068>.
  110. Allaker R., Douglas C. Novel anti-microbial therapies for dental plaque-related diseases. *Int J Antimicrob Agents*, 2009; 33(1): 813-813. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18804350>.
  111. Dai T., Huang Y., Hamblin M. Photodynamic therapy for localized infections-state of the art. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, 2009; 6: 170-188. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2811240>.
  112. Wilson M. Bactericidal effect of laser light and its potential use in the treatment of plaque-related diseases. *Int Dent J*, 1994; 44: 181-189. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8063441>.
  113. Sperandio F., Marotti J., Aranha A., de Eduardo C. Photodynamic therapy for the treatment of recurrent herpes labialis: preliminary results. *Gen Dent*, 2009; 57: 415-419. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19903625>.
  114. Marotti J., Sperandio F., Fregnani E., Aranha A., de Freitas P., de Eduardo C. High-intensity laser and photodynamic therapy as a treatment for recurrent herpes labialis. *Photomed Laser Surg*, 2010; 28: 439-444. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19821702>.
  115. Sperandio F., Simoes A., Aranha A., Correa L., Orsini Machado de Sousa S. Photodynamic therapy mediated by methylene blue dye in wound healing. *Photomed Laser Surg*. 2010; 28: 581-587. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20961226>. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20961226>.
  116. Garcez A., Ribeiro M., Tegos G. *et al.* Antimicrobial photodynamic therapy combined with conventional endodontic treatment to eliminate root canal biofilm infection. *Lasers Surg Med*, 2007; 39: 59-66. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3071045>.
  117. Foschi F., Fontana C., Ruggiero K. *et al.* Photodynamic inactivation of *Enterococcus faecalis* in dental root canals *in vitro*. *Lasers Surg Med*, 2007; 39: 782-787. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18081066>.
  118. Garcez A., Nuñez S., Hamblin M., Ribeiro M. Antimicrobial effects of photodynamic therapy on patients with necrotic pulps and periapical lesion. *J Endod*, 2008; 34: 138-142. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2808698>.
  119. Bonsor S., Nichol R., Reid T., Pearson G. Microbiological evaluation of photo-activated disinfection in endodontics (an *in vivo* study). *Br Dent J*, 2006; 25: 337-341. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16568063>.
  120. Stefano Perni S., Prokopovich P., Pratten J., Parkin I., Wilson M. Nanoparticles: their potential use in antibacterial photodynamic therapy. *Photochem Photobiol Sci*, 2011; 10: 712-720. <http://pubs.rsc.org/en/Content/ArticleLanding/2011/PP/c0pp00360c>.
  121. Firey P., Rodgers M. Photo-properties of a silicon naphthalocyanine: a potential photosensitizer for photodynamic therapy. *Photochem Photobiol*, 1987; 45: 535-538. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1751-1097.1987.tb05414.x/abstract>.
  122. Chatterjee D., Fong L., Zhang Y. Nanoparticles in photodynamic therapy: an emerging paradigm. *Adv Drug Deliv Rev*, 2008; 60: 1627-1637. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18930086>.
  123. König K., Teschke M., Sigusch B., Glockmann E., Eick S., Pfister W. Red light kills bacteria via photodynamic action. *Cell Mol Biol (Paris)*, 2000; 46: 1297-1303. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11075959>.
  124. Alves E., Costa L., Carvalho C. M. *et al.* Charge effect on the photoinactivation of Gram-negative and Gram-positive bacteria by cationic meso-substituted porphyrins. *BMC Microbiol*, 2009; 9: 70. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2672088>.
  125. König K., Schneckenburger H., Ruck A., Steiner R. *In vivo* photoproduct formation during PDT with ALA-induced endogenous porphyrins. *J Photochem Photobiol B*, 1993; 18(2-3): 287-290. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/101113449380077M>.
  126. Wang H., Zhu T., Putt M. *et al.* Broadband reflectance measurements of light penetration, blood oxygenation, hemoglobin concentration, and drug concentration in human intraperitoneal tissues before and after photodynamic therapy. *J Biomed Opt*, 2005; 10: 14004. <http://biomedicaloptics.spiedigitallibrary.org/article.aspx?articleid=1101894>.
  127. Dolgachev V., Oberley L., Huang T. *et al.* A role for manganese superoxide dismutase in apoptosis after photosensitization. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005; 332(2): 411-417. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15894290>.
  128. Kulinsky V. Biochemical aspects of inflammation. *Biochemistry*, 2007; 72(6): 595-607. <http://link.springer.com/article/10.1134%2FS0006297907060028>.
  129. Alexiades-Armenakas M., Geronemus R. Laser-mediated photodynamic therapy of actinic keratoses. *Arch Dermatol*, 2003; 139(10): 1313-1320. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14568836>.
  130. Klepac-Ceraj V., Patel N., Song X. *et al.* Photodynamic effects of methylene blue-loaded polymeric nanoparticles on dental plaque bacteria. *Lasers in Surgery and Medicine*, 2011;



- 43(7): 600-606. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3211097>.
131. Wilson M. Lethal photosensitization of oral bacteria and its potential application in the photodynamic therapy of oral infections. *Photochem Photobiol Sci*, 2004; 3: 412-418. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15122357>.
132. Williams J, Pearson G, Colles M, Wilson M. The effect of variable energy input from a novel light source on the photoactivated bactericidal action of toluidine blue O on *Streptococcus mutans*. *Caries Res*, 2003; 37: 190-193. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12740542>.
133. Sarkar S, Wilson M. Lethal photosensitization of bacteria in subgingival plaque samples from patients with chronic periodontitis. *J Periodontal Res*, 1993; 28: 204-210. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8388448>.
134. Metcalf D, Robinson C, Devine D, Wood S. Enhancement of erythrosine-mediated photodynamic therapy of *Streptococcus mutans* biofilms by light fractionation. *J Antimicrob Chemother*, 2006; 58: 190-192. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16735434>.
135. Wood S, Metcalf D, Devine D, Robinson C. Erythrosine is a potential photosensitizer for the photodynamic therapy of oral plaque biofilms. *J Antimicrob Chemother*, 2006; 57: 680-684. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16464894>.
136. Zanin I, Lobo M, Rodrigues L. *et al.* Photosensitization of in vitro biofilms by toluidine blue O combined with a light-emitting diode. *Eur J Oral Sci*, 2006; 114: 64-69. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16460343>.
137. Zanin I, Goncalves R, Junior A, Hope C, Pratten J. Susceptibility of *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic therapy: an *in vitro* study. *J Antimicrob Chemother*, 2005; 56: 324-330. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15983029>.
138. Soukos N, Socransky S, Mulholland S, Lee S, Doukas A. Photomechanical drug delivery into bacterial biofilms. *Pharm Res*, 2000; 17: 405-409. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10870983>.
139. Soukos N, Mulholland S, Socransky S, Doukas A. Photodestruction of human dental plaque bacteria: enhancement of the photodynamic effect by photomechanical waves in an oral biofilm model. *Lasers Surg Med*, 2003; 33: 161-168. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12949945>.
140. Socransky S, Smith C, Martin L, Paster B, Dewhirst F, Levin A. "Checkerboard" DNA-DNA hybridization. *Biotechniques*, 1994; 17: 788-792. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7833043>.
141. Wood S, Nattress B, Kirkham J. *et al.* 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; 50: 1-7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10443029>.
142. Qin Y, Luan X, Bi L, He G, Bai X, Zhou C, Zhang Z. Toluidine blue-mediated photoinactivation of periodontal pathogens from supragingival plaques. *Lasers Med Sci*, 2008; 23: 49-54. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17361390>.
143. Baptista A, Kato I, Prates R. *et al.* Antimicrobial photodynamic therapy as a strategy to arrest enamel demineralization: a short-term study on incipient caries in a rat model. *Photochem Photobiol*, 2012; 88(3): 584-589.
144. Suci P, Kang S, Gmür R, Douglas T, Young M. Targeted delivery of a photosensitizer to *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* biofilm. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010; 54(6): 2489-2496. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2876373>.
145. Rolim J, de-Melo M, Guedes S. *et al.* The antimicrobial activity of photodynamic therapy against *Streptococcus mutans* using different photosensitizers. *J Photochem Photobiol B*. 2012; 106: 40106:46. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22070899>.
146. Drulis-Kawa Z, Bednarkiewicz A, Bugla-Płoskonska G, Streck W, Doroszkiewicz W. The susceptibility of anaerobic bacteria isolated from periodontal diseases to photodynamic inactivation with Fotolon (chlorin e6). *Pol J Microbiol*, 2005; 54(4): 305-310. [http://www.researchgate.net/publication/7181092\\_The\\_susceptibility\\_of\\_anaerobic\\_bacteria\\_isolated\\_from\\_periodontal\\_diseases\\_to\\_photodynamic\\_inactivation\\_with\\_Fotolon\\_%28chlorin\\_e6%29](http://www.researchgate.net/publication/7181092_The_susceptibility_of_anaerobic_bacteria_isolated_from_periodontal_diseases_to_photodynamic_inactivation_with_Fotolon_%28chlorin_e6%29).
147. Mang T, Tayal D, Baier R. Photodynamic therapy as an alternative treatment for disinfection of bacteria in oral biofilms. *Lasers Surg Med*, 2012; 44(7): 588-596. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22847720>.