

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ
ФАКУЛТЕТ ПО ДЕНТАЛНА МЕДИЦИНА
КАТЕДРА „КОНСЕРВАТИВНО ЗЪБОЛЕЧЕНИЕ”
Ръководител: проф. д-р Радосвета Василева, дм

Д-р Виолета Димитрова Доганджийска

**ВЪЗДЕЙСТВИЕ НА ФОТОАКТИВИРАНА
ДЕЗИНФЕКЦИЯ И ER:YAG ЛАЗЕР ПРИ
ДЪЛБОКИ КАРИОЗНИ ЛЕЗИИ
(експериментални и клиничко-лабораторни
изследвания)**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд за придобиване на
образователната и научна степен „доктор”

Научна специалност

03.03.01. Терапевтична стоматология

Научен ръководител

Проф. д-р Славчо Крумов Димитров, дм

Проф. д-р Цонко Тодоров Узунов, дм

Рецензенти

Проф. д-р Снежанка Топалова-Пиринска, дм

Проф. д-р Стоян Владимиров, дм

София, 2016 г.

Дисертационният труд се състои от 178 страници и е онагледен с 22 таблици, 27 фигури и 2 приложения. В библиографията са включени 330 литературни източника, от които 53 на кирилица и 277 на латиница.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита на заседание на разширен катедрен съвет на катедра „Консервативно зъболечение” при Факултета по дентална медицина на Медицинския университет – София.

Публичната защита ще се състои на 21.03.2016 год., от 13.30 ч., в първа аудитория на ФДМ, МУ – София, бул. „Св. Георги Софийски” № 1, съгласно чл. 76 и 77 от Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в Медицинския университет – София, и заповед № РК 36-3432/11.12.2015 г. на Ректора на МУ – София, на открито заседание на **научното жури** в състав:

Председател

Проф. д-р Радосвета Василева, дм – вътрешен член

Членове

Проф. д-р Снежанка Топалова-Пиринска, дм – вътрешен член и рецензент

Проф. д-р Стоян Владимиров, дм – външен член и рецензент

Проф. д-р Славчо Димитров, дм – външен член и научен ръководител

Доц. д-р Иван Ангелов, дфн – външен член

Резервни членове

Доц. д-р Иванка Димитрова, дм – вътрешен член

Доц. д-р Нешка Манчорова, дм – външен член

Материалите по защитата са на разположение в Катедрата по консервативно зъболечение на Факултета по дентална медицина при Медицинския университет – София, и са публикувани на интернет страницата на МУ – София.

Забележка: В автореферата номерата на таблиците и фигурите не съответстват на номерата в дисертационния труд.

СЪДЪРЖАНИЕ

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ.....	4
I. ВЪВЕДЕНИЕ	5
II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	7
III. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ	8
IV. РЕЗУЛТАТИ	19
V. ОБСЪЖДАНЕ	45
VI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	62
VII. ИЗВОДИ	66
VIII. ПРИНОСИ	68
IX. ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....	70

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

ВЛ	Вестибуло-лингвален
ГЙЦ	Глас-йономерен цимент
ЗП	Зъбна пулпа
ИАЛ	Изпълнителна агенция по лекарствата
КМ	Композиционен материал
МД	Медио-дистален
МО	Микроорганизми
ТЗТ	Твърди зъбни тъкани
ФАД	Фотоактивирана дезинфекция
ФДТ	Фотодинамична терапия
ФС	Фотосенсибилизатор
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium (<u>Модифицирана Игъл</u> хранителна среда на Дюлбеко)
EDTA	Етилендиаминтетраоцетна киселина
GaPc	Галий-съдържащ фотосенсибилизатор
HE	Хематоксилин-еозин
MRSA	Метицилин резистентен <i>Staphylococcus aureus</i>
MSP	Средно къс лазерен импулс
PBS	Буфериран физиологичен разтвор
SP	Къс лазерен импулс
ZnPc	Цинк-съдържащ фотосенсибилизатор
α Gal-ZnPc	α -галактоза заместен цинк-съдържащ фотосенсибилизатор
β Gal-ZnPc	β -галактоза заместен цинк-съдържащ фотосенсибилизатор

I. ВЪВЕДЕНИЕ

Зъбният кариес е едно от най-често срещаните хронични заболявания в света. Съвременните тенденции при третиране на кариозни лезии целят максимално консервативна кавитетна препарация, с минимално отстраняване на твърди зъбни тъкани и запазване на потенциално репарабилен, афектиран дентин, който може да бъде реминерализиран.

Смята се, че липсата на микроорганизми (МО) е от първостепенно значение за успешния изход при лечение на дълбоки кариозни лезии, за запазване на виталитета на зъбната пулпа (ЗП) и за подобряване дългосрочната прогноза на зъба.

По литературни данни, след конвенционална екскавация и медикация, наличие на живи МО под obtурациите се установява повече от година след дефинитивното obtуриране на кавитета. Виталните бактерии биха могли да инициират развитието на нова кариозна лезия и/или да причинят увреждане на ЗП през дентиновите каналчета (директно и индиректно), особено при тънък надпулпен дентин и дълбоки кариозни лезии.

С цел отстраняване на остатъчните МО се прилагат различни антимицробни препарати. Някои оказват дразнещо действие и могат да увредят ЗП. Други водят до намаляване здравината на адхезивната връзка с композиционния материал, не притежават достатъчно силен антибактериален ефект или не отстраняват напълно замърсяващия слой.

В търсене на максимално ефективен, но с минимален увреждащ ефект антибактериален метод, в последните години се разработват алтернативни методики. Приложението на лазерно лъчение в денталната практика придобива все по-широка популярност. Лазерният лъч има доказано бактерицидно действие, премахва замърсяващия слой, притежава биостимулиращ ефект. Смята се, че лазерната светлина може да достигне области, недостъпни за традиционните техники, тъй като дентиновите каналчета действат ефективно като

фиброоптични канали, пренасочвайки светлината в различни посоки.

При третиране на дълбоки кариозни лезии приложение намират ниско- и високоенергийни лазерни системи. Високоенергийните лазери се използват за кавитетна подготовка с цел селективно отстраняване на кариозния дентин, максимално запазване на здрави ТЗТ и постигане на бактерициден ефект. Едно от съвременните направления за приложение на нискоенергийни лазерни системи е фотоактивираната дезинфекция (ФАД). Методът включва използване на нетоксично фоточувствително багрило – фотосенсибилизатор (ФС), комбинирано с видима светлина с определена дължина на вълната, която отговаря на абсорбционния спектър на ФС.

Недостатъчно изяснените въпроси относно възможностите на лазерите и ФАД за елиминиране на бактериалната микрофлора, в зависимост от особеностите на МО и параметрите на работа, определят актуалността на проблема и необходимостта от допълнителни изследвания.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

1. Цел

Цел на настоящия дисертационен труд е да се проучи чрез експериментални и клиничко-лабораторни изследвания въздействието на фотоактивираната дезинфекция и високоенергийния Er:YAG лазер при дълбоки кариозни лезии.

2. Задачи

За реализиране на поставената цел си поставихме следните задачи:

1. *In vitro* изследване за цитотоксичност на различни фотосенсибилизатори (Zn-съдържащи ФС, GaPs, Fotosan) върху клетъчни култури от ембрионални фибробласти от мишка.

2. *In vitro* изследване за фототоксичност на лазерно лъчение с различни дължини на вълната (Er:YAG, Nd:YAG и диоден лазер) върху клетъчни култури от ембрионални фибробласти от мишка.

3. *In vivo* изследване на биологичната поносимост (цитотоксичност и фототоксичност) на ФС и лазерно лъчение върху опитни животни.

4. Изследване на антимикробната активност на ФАД върху референтни бактериални щамове (*S. mutans*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *C. albicans*).

5. *In vitro* изследване на температурните промени при кавитетна препарация с високоенергиен Er:YAG лазер.

6. Сравнително **клиничко-лабораторно** изследване на антимикробната активност на ФАД, конвенционални препарати и Er:YAG лазер върху микроорганизми, изолирани от дълбоки кариозни лезии.

III. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

1. Материал

Проведени са експериментални и клиничко-лабораторни изследвания.

Обект на изследване са:

- **Клетъчни култури** – фибробластни клетъчни линии Balb/c 3T3 (clone 31). Използвани са 33 броя 96-ямкови плаки (Orange Scientific). Изследвани са клетъчни култури в 792 броя ямки с размер 5 mm.

- **Опитни животни** – 72 бели мъжки плъха порода “Wistar” с тегло 200–250 g. Материал за хистологично изследване е взет от 144 участъка. Подготвени и микроскопски изследвани са 430 хистологични препарата.

- **Екстрахирани интактни човешки зъби** – 26 броя (10 молара и 16 премолара).

- **Референтни бактериални щамове** – 4 вида (*Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*). Използвани са 23 броя 12-ямкови плаки. Изследвани са посежки в 270 броя ямки с размер 22 mm.

- **Пациенти** – препарирани са 50 кавитета (I и II клас) на 50 пациенти (30 мъже и 20 жени) с дълбоки, акутни кариозни лезии. Изследвани са 85 микробиологични проби – посежки в 85 броя пластмасови петрита с размер 90 mm.

За целите на изследванията са използвани:

- **Фотосенсибилизатори** – три Zn-съдържащи новосинтезирани фотосенсибилизатори (α Gal-ZnPc, β Gal-ZnPc и ZnPc; БАН); галий-съдържащ новосинтезиран фотосенсибилизатор (GaPc; БАН); комерсиален фотосенсибилизатор Фотосан (FotoSan, Agent High, Denmark).

- **Лазерни източници** – диоден лазер с дължина на вълната $\lambda=635$ nm (БАН); диоден лазер с $\lambda=665$ nm (ЛАХТА-МИЛОН); Nd: YAG лазер с $\lambda=1064$ nm (Fotona, AT Fidelis); Er: YAG лазер с $\lambda=2940$ nm (Fotona, AT Fidelis).

- **Разтвори** – Тубулицид – син (Tubulicid Blue label, Dental therapeutics); Aqua destillata (Sofarma).

- **Хранителни среди** – кръвен агар с 5% овнешка кръв; Мак Конки агар; Сабуро агар; бульон на Тароци; шоколадов агар с ванкомицин; соево-казеинов агар с добавка 0.5% дрождев екстракт (Trypticase® Соев агар).

- **Инфрачервена термовизионна камера** – Flir A310 (FLIR Systems, Inc., 27700 SW Parkway Avenue, Wilsonville, OR 97070).

2. Методи

- **Лабораторни методи**

- ✓ Изследване за цито- и фототоксичност върху клетъчни култури

- ✓ Хистологични методи

- ✓ Микробиологични методи

- ✓ Термографско изследване

- **Клинико-лабораторни методи**

- ✓ Кавитетна препарация и микробиологично изследване

- **Статистически методи**

Методи по задачи

2.1. По задача 1. *In vitro* изследване за цитотоксичност на различни фотосенсибилизатори (Zn-съдържащи ФС, GaPs, Fotosan) върху клетъчни култури от ембрионални фибробласти от мишка

Изследванията за безвредност *in vitro* са проведени както е описано от Borenfreund and Puerner (1985) и последната модификация (2008) на валидизирания Balb/c 3T3 (clone 31) Neutral Red Uptake Assay (3T3 NRU тест) за цитотоксичност.

Използвани са фибробластни клетъчни линии Balb/c 3T3 (clone 31), получени от Centro Substratti Cellulari, Brescia, Италия. Култивирани са като монослой в 75 cm² съдове за клетъчни култури (Orange Scientific) в хранителна среда DMEM с ниско съдържание на глюкоза (1%) (ЕЛТА 90 ООД), допълнена с 10%

фетален телешки серум (Sigma) и антибиотици в обичайните концентрации. След рутинна трипсинизация клетки от линията Valb/c 3T3 са засети в 96-ямкови плаки (Orange Scientific) в концентрация $1 \times 10^5/\text{ml}$ и култивирани за 24 h. Третирането е извършено с тест-съединенията, разредени в PBS serum-free medium, за достигане на желаните концентрации. Изследвани са осем различни концентрации – от 10 до $0.125 \mu\text{M}$.

В зависимост от използвания фотодинамичен агент и параметрите на облъчване клетъчните култури са разделени на 7 групи:

1. Група I – третиране с вещество α (Zn-1 комплекс – α Gal-ZnPc) и лазерно облъчване ($\lambda=635 \text{ nm}$, $t=10 \text{ min}$, 60 J/cm^2).

2. Група II – третиране с вещество β (Zn-2 комплекс – β Gal-ZnPc) и лазерно облъчване ($\lambda=635 \text{ nm}$, $t=10 \text{ min}$, 60 J/cm^2).

3. Група III – третиране с вещество ZnPc (Zn-3 комплекс) и лазерно облъчване ($\lambda=635 \text{ nm}$, $t=10 \text{ min}$, 60 J/cm^2).

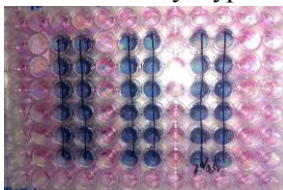
4. Група IV – третиране с GaPc (Ga-комплекс) и лазерно облъчване ($\lambda=635 \text{ nm}$, $t=10 \text{ min}$, 60 J/cm^2).

5. Група V – третиране с FotoSan (Agent High) и лазерно облъчване ($\lambda=635 \text{ nm}$, $t=10 \text{ min}$, 60 J/cm^2).

6. Група VI – тъмнинен контрол (негативен контрол) – третиране на клетъчните култури с горепосочените вещества, без лазерно облъчване.

7. Група VII – светлинен контрол (позитивен контрол) – клетъчни култури, третирани само с лазерно облъчване ($\lambda=635 \text{ nm}$, $t=10 \text{ min}$, 60 J/cm^2) (фиг. 1).

След третирането клетъчните култури са култивирани за 24 h.



Фиг. 1. Клетъчни култури от ембрионални фибробласти от мишка

След инкубиране с хранителна среда, съдържаща Neutral Red, промиване и извличане на багрилото, абсорбцията е измерена на TECAN ELISA reader при 540 nm. Всеки експеримент е проведен трикратно.

2.2. По задача № 2. *In vitro* изследване за фототоксичност на лазерно лъчение с различни дължини на вълната (Er:YAG, Nd:YAG и диоден лазер) върху клетъчни култури от ембрионални фибробласти от мишка

Използваните клетъчни линии, тяхната подготовка и тест за оценка на резултатите са същите, като в задача 1.

Клетките са разделени на 4 групи в зависимост от източника на лазерна светлина, а всяка от тях допълнително – на 2 подгрупи в зависимост от параметрите на облъчване.

1. Група I – лазерно облъчване с диоден лазер, ЛАХТА-МИЛОН ($\lambda=665$ nm, мощност 500 mW, непрекъснат режим на излъчване, разстояние 1 mm от целевата точка, сканираща методика) (n=24):

1.1. Индиректно лазерно облъчване през дентинов шлиф с дебелина 1 mm – облъчени са 12 ямки по 1 min всяка (n=12).

1.2. Индиректно лазерно облъчване през дентинов шлиф с дебелина 1 mm – облъчени са 12 ямки по 3 min всяка (n=12).

2. Група II – лазерно облъчване с Nd: YAG лазер, Fotona, AT Fidelis ($\lambda=1064$ nm, 200 μ m диаметър на влакното, импулсен режим на излъчване MSP (100 μ s), мощност 1.5 W, честота 15 Hz, разстояние 1 mm от целевата точка, сканираща методика) (n=24):

2.1. Индиректно лазерно облъчване през дентинов шлиф с дебелина 1 mm – облъчени са 12 ямки по 1 min всяка (n=12).

2.2. Индиректно лазерно облъчване през дентинов шлиф с дебелина 1 mm – облъчени са 12 ямки по 3 min всяка (n=12).

3. Група III – лазерно облъчване, Er: YAG лазер, Fotona, AT Fidelis ($\lambda= 2940$ nm, RO2 – безконтактна ръкохватка, импулсен режим на облъчване SP (300 μ s), мощност 0.40 W, 40 mJ, честота 10 Hz, без водно и въздушно охлаждане, разстояние 1 mm от целевата точка, сканираща методика) (n=24):

3.1. Индиректно лазерно облъчване през дентинов шлиф с дебелина 1 mm – облъчени са 12 ямки по 5 s всяка (n=12).

3.2. Индиректно лазерно облъчване през дентинов шлиф с дебелина 1 mm – облъчени са 12 ямки по 10 s всяка (n=12).

4. Група IV – контролна група (тъмнинна токсичност) – нетретирани клетки.

2.3. По задача № 3. *In vivo* изследване на биологична поносимост (цитотоксичност и фототоксичност) на ФС и лазерно лъчение върху опитни животни

За нуждите на изследването са използвани 72 бели мъжки плъха порода “Wistar” с тегло 200–250 g. След 10-дневен карантинен период животните са разделени на случаен принцип в 4 групи по 18 животни според изследваните вещества и периода на наблюдение:

1. I група – животни, инжектирани с ZnPc (новосинтезиран металфталоцианин (c=10 μmol) (n=18).

2. II група – животни, инжектирани с GaPc (новосинтезиран металфталоцианин (c=10 μmol) (n=18).

3. III група – животни, инжектирани с Fotosan (Agent High, търговски продукт) (n=18).

4. IV група – животни, инжектирани с физиологичен разтвор 0.9% (контролна група) (n=18).

Изследваните вещества са инжектирани субкутанно в областта на двете скапули в равни количества в ляво и дясно (по 0.15 ml). Пет минути след инжектирането десният участък от кожата е облъчен с червен диоден лазер – апарат „Лахта-Милон”, $\lambda=665$ nm. Параметри на облъчване: F=0 (непрекъснато излъчване), PR=4, E=999, P=200, мощност 500 mW, изходяща мощност 400 mW, диаметър на петното 2 cm, време на облъчване 10 min за активиране на фотодинамичния процес. След изтичане на обследвания период животните са евтаназирани чрез пречупване на гръбначния стълб в областта на шийните прешлени в съответствие на Наредба № 15 от 03.02.2006 г. за минимални изисквания за защита и хуманно отношение към

опитните животни. Животните от всяка група са разделени на случаен принцип по 6 броя в три подгрупи според времето на евтаназия:

1. I подгрупа – евтаназия 24 ч. след третиране.

2. II подгрупа – евтаназия 72 ч. след третиране (3 дни).

3. III подгрупа – евтаназия 7 дни след третиране.

След евтаназията са отпрепарирани кожни ламба, извършени са макроскопски оглед и описание на находката в третираните участъци, след което е взет материал за хистологично изследване от 144 участъка. Изготвени и микроскопски анализирани са 430 хистологични препарата.

2.4. По задача № 4. Изследване на антимикробна активност на ФАД върху референтни бактериални щамове (*S. mutans*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *C. albicans*)

Използвани са бактериални суспензии от съответния микроорганизъм (*S. mutans*, *E. faecalis*, MRSA, *C. albicans*) с клетъчна плътност $>10^6$ cells/mL, подготвени във фосфат-буфериран физиологичен разтвор (PBS) преди измерването. Проби от 1 ml бактериална суспензия се инкубират с 5 μ L основен разтвор на съответния металфталоцианин (до крайна концентрация на ФС между 1–3 μ M) в продължение на 15 min на тъмно при 22°C с леко разбъркване на магнитна бъркалка и се покриват с алуминиево фолио. При експеримента с Фотосан се добавя равен обем препарат с крайна концентрация на активното вещество – толуидиново синьо 88.6 μ M (1:3 крайно разреждане на Фотосан) и съответно 44.3 μ M (1:6 крайно разреждане на Фотосан).

След инкубирането равни количества от суспензията (200 μ L) са поставени в стандартна полистиренова плака за микротитруване с 96 кладенчета, където се провежда облъчването. Използван е светлинен източник със светлинно излъчващи диоди $\lambda=635$ nm (БАН). **Параметри на облъчване:** плътност на мощността 100 mW/cm² (контролирана чрез

фотометър Spectra Physics, USA), светлинна доза 6–60 J/cm², време на експозиция – 1, 5, 12, 20 min.

Отчетени са и три контролни проби:

1. бактерии без фотосенсибилизатор, но с облъчване (за светлинна токсичност);

2. бактерии с фотосенсибилизатор, но без облъчване (за тъмнинна токсичност);

3. само бактериална суспензия (без фотосенсибилизатор, без облъчване, на тъмно).

След облъчването на плаките са изтеглени проби по 0.1 ml и серийно са разредени 10-кратно с фосфат-буфериран физиологичен разтвор (PBS). Равни количества (0.1 ml) от всеки разтвор се посяват в петрита със среда от соево-казеинов агар с добавка 0,5% дрождев екстракт (Trypticase® Соев агар). Броят на колонии (CFU /ml) при всяко разреждане е отчетен след 48 h инкубация при 37°C и аеробно култивиране, а за *Streptococcus mutans* – 48 h инкубация при 37°C микроаерофилно култивиране.

Всеки експеримент е извършен трикратно, като данните (броят живи клетки) са представени като средна стойност ± стандартно отклонение (SD).

2.5. По задача № 5. *In vitro* изследване на температурните промени при кавитетна препарация с високоенергиен Ег:YAG лазер

Използвани са 26 прясно екстрахирани, интактни човешки зъба (10 молара и 16 премолара). Отстранена е кореновата част на зъбите, като срезът е направен в областта на пулпна камера, така че да се открие и запази таванът ѝ. В коронарната част на зъбите са препарирани I клас кавитети с турбинен наконечник, водно-въздушно охлаждане и диамантени борери. Препарираните кавитетите са с размер: МД = 4 mm, ВЛ = 3 mm, а дълбочината им е такава, че дебелината на надпулпния дентин при всички образци да бъде 1.5 mm (контролирано чрез дебеломер). Зъбите

са фиксирани в силиконови държатели и са темперирани за 30 min в помещение с температура 22°C (фиг. 2).



Фиг. 2. Опитни образци

За окончателна кавитетна подготовка на пулпната основа е използван високоенергиен Er:YAG лазер, AT Fidelis, Fotona, $\lambda=2940$ nm, безконтактна ръкохватка R02. **Параметри на работа:** програма за третиране на Caries profunda – импулсен режим на облъчване SP (300 μ s), мощност =1.2 W, лазерна енергия =120 mJ, честота =10 Hz, водно охлаждане 6 степен, въздушно охлаждане 4 степен. Лазерният лъч е насочен перпендикулярно спрямо ТЗТ, ръкохватката е позиционирана на разстояние 1 cm от пулпната основа, работи се по сканираща методика.

За отчитане на температурните промени при лазерната кавитетна подготовка е използвана последна генерация инфрачервена термоизобразителна камера Flir A310, фиксирана статично на разстояние 1.5 m (фиг. 3). За всеки зъб са записани по 4 термоизобразителни измервания през 14 sec всяко. За всяко измерване са регистрирани минимална, средна и максимална стойност на температурата.



Фиг. 3. Термоизобразителна регистрация на температура

Термоизобразителният запис и анализ на данните е извършен със софтуер ThermaCam Reporter 8.3 Pro.

2.6. По задача № 6. Сравнително клиничко-лабораторно изследване на антимикробната активност на ФАД, конвенционални препарати и Ег:YAG лазер върху микроорганизми, изолирани от дълбоки кариозни лезии

Подбрани са 50 пациенти (30 мъже и 20 жени, 18–41 г.) с постоянни зъби със завършено кореново развитие и първични, акутно протичащи дълбоки кариозни лезии, позволяващи запазване на виталитета на зъбната пулпа и прилагане на метода на индиректно пулпно покритие. Пациентите са без придружаващи заболявания, подписали са информирано съгласие. Всички препарирани кавитети са I и II клас (оклузални и апроксимални лезии на премолари и молари). Преди кавитетна подготовка устата се изплаква с антисептичен разтвор, зъбите са почистени от зъбна плака и зъбен камък, полирани и изолирани с кофердам.

Пациентите са разделени на 3 групи в зависимост от начина на третиране на кавитетите:

1. Група I – приложение на ФАД (n=20)

Зъбите са препарирани по конвенционална методика с високо и нискооборотни наконечници и водно-въздушно охлаждане. От всеки кавитет са взети по две микробиологични проби:

– **Група I.1.** – микробиологична проба след третиране на кавитета с дестилирана вода (n=20).

– **Група I.2.** – микробиологична проба след третиране на кавитета с ФАД (фотосенсибилизатор Fotosan (Agent High) и облъчване с диоден лазер ($\lambda=635\text{ nm}$, плътност на мощността 100 mW/cm^2 , светлинна доза 6 J/cm^2 , за 60 sec) (n=20).

2. Група II – приложение на Тубулицид (син) (n=15)

Зъбите са препарирани по конвенционална методика с високо и нискооборотни наконечници и водно-въздушно охлаждане. От всеки кавитет са взети по две микробиологични проби:

– **Група II.1.** – микробиологична проба след третиране на кавитета с дестилирана вода (n=15).

– **Група II.2.** – микробиологична проба след третиране на кавитета с р-р на Тубулицид за 60 сек (n=15).

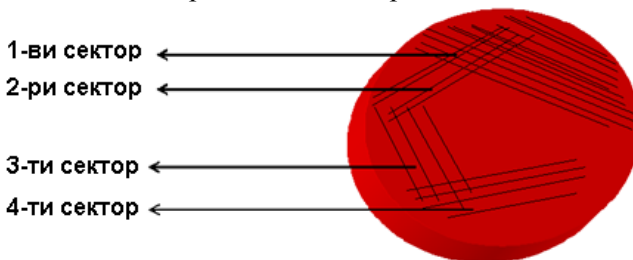
3. Група III – приложение на високоенергиен Er:YAG лазер (n=15)

Зъбите са препарирани с Er:YAG – лазер (AT Fidelis, Fotona ($\lambda=2940$ nm, безконтактна ръкохватка R02, импулсен режим на облъчване SP (300 μ s), мощност =1.2 W, лазерна енергия =120 mJ, честота =10 Hz, 6 степен водно охлаждане, 4 степен въздушно охлаждане, разстояние 1 mm от стените на кавитета, сканираща методика (програма за третиране на Caries profunda).

От всеки кавитет е взета по една микробиологична проба:

– **Група III.1.** – микробиологична проба след препариране на кавитета с високоенергиен Er:YAG лазер (n=15).

Пробите са поставени в епендорф със стандартна транспортна среда Stuart и са транспортирани в микробиологична лаборатория за определяне на микробното число и идентификация на изолираните микроорганизми (фиг. 4). Изследвани са 85 микробиологични проби от 50 кавитета.



Фиг. 4. Количествен метод на щрихите

Дефинитивното възстановяване на всички кавитети е извършено едноетапно по метода на индиректно пулпно покритие (калциево-хидроксиден цимент (Dycal, DENTSPLY DeTrey GmbH), ГЙЦ (Glass-Liner, Willmann & Pein GmbH), КМ (Tetric EvoCeram, Vivadent).

2.7. Статистически методи

За статистически анализ на данните е използвана софтуерна приложна програма SPSS 19.0. За графичните изображения е използвана софтуерна приложна програма Microsoft Excel 2007. За ниво на значимост, при което се отхвърля нулевата хипотеза, е избрано $p < 0.05$.

1. Дескриптивен анализ – в табличен вид е представено честотното разпределение на разглежданите признаци, разбити по групи на изследване.

2. Вариационен анализ – при описание на количествени показатели с нормално или близко до нормалното разпределение.

3. Т-тест за две зависими извадки (Paired Samples Test) – проверка за равенство на две средни при нормално разпределение.

4. Непараметричен тест на McNemar – за проверка на хипотези за различие на две зависими извадки.

5. Непараметричен тест на Kruskal–Wallis – за проверка на хипотези за различие между няколко независими извадки.

6. Непараметричен Student's test (two-tailed unpaired Student's test) – за проверка на хипотези за различие между две независими извадки.

7. Точен тест на Фишер (Fisher's Exact Test) – за търсене на статистическа зависимост на качествените променливи.

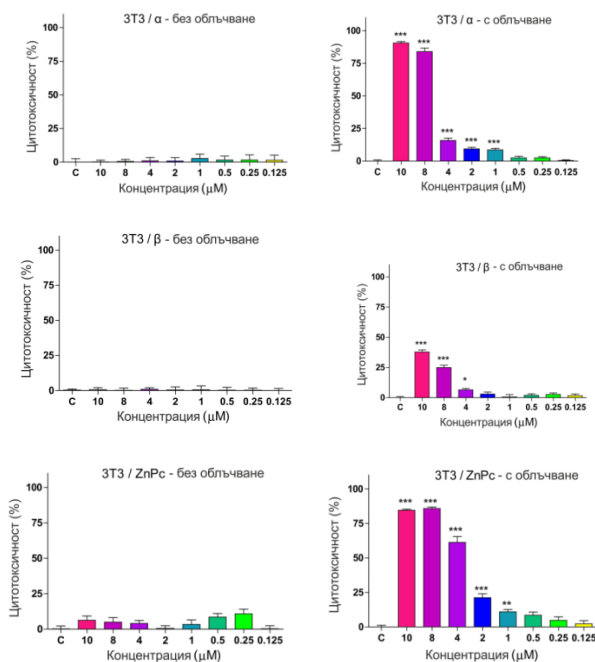
8. Еднофакторен дисперсионен анализ (One-way ANOVA) – за проверка на хипотези за различие между няколко независими извадки.

9. Пост хок анализ на Бонферони (Bonferroni's post hoc test) – за множествено сравнение.

IV. РЕЗУЛТАТИ

По задача № 1. *In vitro* изследване за цитотоксичност на различни фотосенсибилизатори (Zn-съдържащи ФС, GaPc, Fotosan) върху клетъчни култури от ембрионални фибробласти от мишка

Резултатите за цитотоксичност на Zn-съдържащи ФС са представени на фиг. 5.



Фиг. 5. Цитотоксичност и фототоксичност на Zn-съдържащи новосинтезирани фотосенсибилизатори

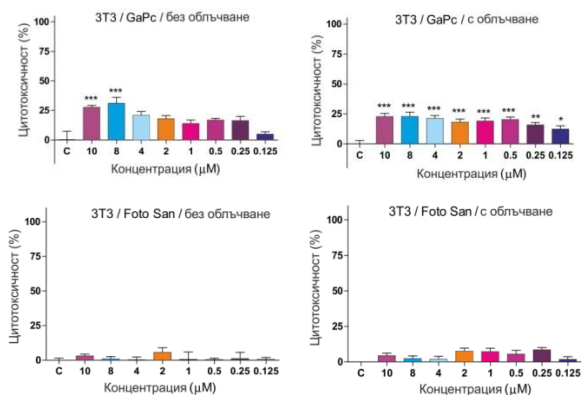
Легенда: С – нетретиранни клетки (негативна контрола); * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

Резултатите от валидизирания Balb/c 3T3 (клон 31) Neutral Red Uptake Assay (3T3 NRU тест) показват пълно отсъствие на тъмнинна токсичност при фотосенсибилизаторите α и β за всички

приложени концентрации в границите от 0.125 до 10 μM . При отсъствие на специфичен светлинен източник фотосенсибилизаторът ZnPc индуцира пренебрежимо ниска цитотоксичност, без наличие на статистически значима разлика с нетретираните контролни клетъчни култури.

След прилагане на ФС и облъчване при всички изследвани групи се установява зависимост от концентрацията на изследваните вещества цитотоксичен ефект. Фотосенсибилизаторите α и ZnPc предизвикват статистически значима цитотоксичност при концентрации от 10 до 1 μM . Фотосенсибилизатор β индуцира статистически значима цитотоксичност при концентрация от 10 до 4 μM .

Резултатите за цитотоксичност на GaPc и Fotosan са представени на фиг. 6.



Фиг. 6. Цитотоксичност и фототоксичност на Галий-съдържащ новосинтезиран фотосенсибилизатор (GaPc) и комерсиален фотосенсибилизатор FotoSan (Agent High)

Легенда: С – нетретирани клетки (негативна контрола); * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

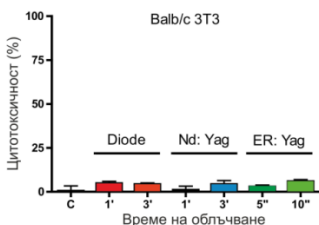
Фотосенсибилизаторът GaPc показва статистически значима ($p < 0.001$) тъмнинна цитотоксичност при концентрации 10 и 8

μM. Установена е статистически достоверна (от $p < 0.001$ до $p < 0.05$) светлинна цитотоксичност в широки граници на концентрациите (от 10 до 0.125 μM) към миши ембрионални фибробласти в сравнение с нетретираните контролни клетъчни култури.

Комерсиалният препарат FotoSan (Agent High) не показва както тъмнинен, така и светлинен цитотоксичен ефект в обхвата на приложените концентрации.

По задача № 2. *In vitro* изследване за фототоксичност на лазерно лъчение с различни дължини на вълната (Er:YAG, Nd:YAG и диоден лазер) върху клетъчни култури от ембрионални фибробласти от мишка

Резултатите от изследванията за цитотоксичен ефект на трите клинично използвани източници на лазерна светлина – диоден, Nd:YAG и Er:YAG лазери, са представени на фиг. 7.



Фиг. 7. Фототоксичност на клинично използвани лазерни източници върху клетъчни култури от постоянната клетъчна линия Balb/c 3T3 (клон 31)

Изследваните три източника на лазерна светлина, след съответните периоди на облъчване, предизвикват фототоксичен ефект, който е под 10% в използваната клетъчно-културална система.

Най-слабо изразен е фототоксичният ефект на Nd:YAG лазера при облъчване за 1 min, а най-изявена фототоксичност е регистрирана след облъчване с Er:YAG лазер за 10 sec.

Установява се тенденция за нарастване на цитотоксичния ефект с нарастване на времето на облъчване и при трите светлинни източника.

По задача № 3. *In vivo* изследване на биологичната поносимост (цитотоксичност и фототоксичност) на ФС и лазерно лъчение върху опитни животни

Резултатите от проведените изследвания са получени въз основа на макроскопски оглед и описание на находката, както и на микроскопски оглед и оценка на хистологичните препарати.

I. Макроскопска находка

Макроскопски при всички групи е установено специфично оцветяване на подкожната съединителна тъкан в зоната на апликация. Оцветяването е идентично с цвета на изследвания материал (син или синьо-зелен), но с намален интензитет.

1. Контролни животни

И при трите експериментални срока за наблюдение макроскопската находка не показва патологични отклонения.

2. Третиран животни

2.1. I и II група (животни, третирани с ZnPc и GaPc)

Третираните животни от I и II група показват сходна макроскопска картина, поради което ще бъдат описани заедно.

На 1 ден (24 час) макроскопски не се намира съществена промяна в еластичността на кожата, липсват иритативни изменения и сраствания.

На 3 ден (72 час) при единични животни се наблюдават хиперемирани съдове в зоната на третиране.

На 7 ден при единични животни се установяват леки еластични прираствания на фасциите под формата на тънки белезникави единични повлекла, както и хиперемирани съдове в зоната на третиране.

При всички животни за трите срока на наблюдение не се установяват различия между третираните с лазер и нетретираните кожни полета.

2.2. III група (животни, третиран с Fotosan – Agent High)

При всички изследвани животни за трите срока на наблюдение макроскопски и при палпация се установява уплътняване на кожата, загуба на еластичност и подвижност спрямо подлежащите структури. Не се установяват макроскопски различия по отношение на третиран и нетретиран с лазер зони.

На 1 ден (24 час) при отпрепариране на кожно ламбо при някои животни се установява формиране на кисти с нежни стени, изпълнени с кехлибарена течност и периферни нежни сраствания, с размер приблизително 10/12 до 15 mm.

На 3 ден (72 час) при по-голям брой животни в сравнение с предходната група се установява формиране на кисти с горепосочените характеристики.

На 7 ден при отпрепариране на кожно ламбо при всички животни се установява формиране на кисти с характеристики, описани при предходните групи.

II. Микроскопска находка

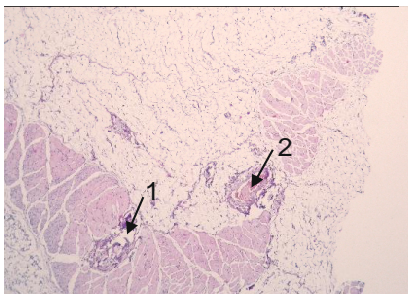
Цел на хистологичното изследване е установяване на наличие на остри реакции при субкутанно прилагане на изследваните вещества (некрози, еозинофилна пролиферация, прояви на алергични реакции и т.н.). Направен е сравнителен анализ на въздействието на изследваните вещества върху тъканите според четири групи критерии – хиперемия, оток, възпаление, други.

Описанието на микроскопската находка е представено на табл. 1, фиг. 8, 9 и 10.

Табл. 1. Хистоморфологична микроскопска находка

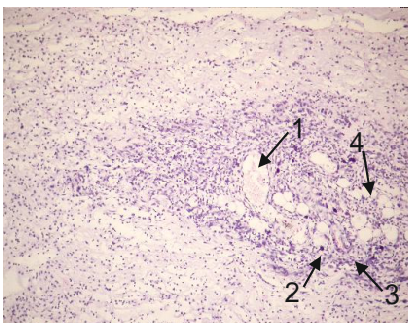
Време	Подгрупи	ФС	Хистоморфологични промени			
			Хиперемия + или -	Оток + или -	Възпаление ¹ 0 до 3	Други ² бр. Животни
1 ден	Контрола	Zn	-	-	0	-
		Ga	-	-	0	-
		Ph.	-	-	0	-
	Без облъчване	Zn	+	-	1	-
		Ga	-	+	1	-
		Ph.	+	+	2	2 - К; 3 - НЛ
	С облъчване	Zn	+	-	2	-
		Ga	+	+	2	2 - К, 1 - НЛ
		Ph.	+	+	3	3 - К; 4 - НЛ
3 дни	Контрола	Zn	-	-	0	-
		Ga	-	-	0	-
		Ph.	-	-	0	-
	Без облъчване	Zn	+	+	2	-
		Ga	+	-	1	-
		Ph.	+	+	2	2 - К; 3 - НЛ
	С облъчване	Zn	+	+	3	1 - К
		Ga	+	+	2	1 - К; 1 - Н
		Ph.	+	+	3	3 - К; 4 - НЛ; 1 - Н; 1 - КА
7 дни	Контрола	Zn	-	-	0	-
		Ga	-	-	0	-
		Ph.	-	-	0	-
	Без облъчване	Zn	+	-	1	1 - НЛ
		Ga	+	+	1	1 - Н
		Ph.	+	-	1	2 - К
	С облъчване	Zn	+	-	1	2 - НЛ
		Ga	+	+	2	1 - Ка
		Ph.	+	+	3	3 - К; 4 - НЛ; 1 - ЕЛ

Легенда: ФС – фотосенсибилизатори; ¹ Степени на възпаление: 0 – липсва; 1 – лека; 2 – умерена; 3 – тежка. ² Други: К – кисти; НЛ – неутрофилни левкоцити; ЕЛ – еозинофилни левкоцити; Н – некрози; КА – калцификати.



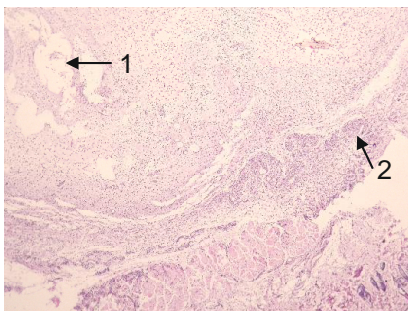
Фиг. 8. Зона, третирана с ZnPs и облъчване, 7 ден (оцветяване HE, увеличение x 10)

Легенда: 1 – Дилатиран венозен съд с кръвен застой; 2 – Артериален съд с хиперемия



Фиг. 9. Зона, третирана с GaPs без облъчване, 7 ден (оцветяване HE, увеличение x 10)

Легенда: 1 – Хиперемиран венозен съд; 2 – Калцификат; 3 – Възпалителна реакция; 4 – Лек оток



Фиг. 10. Зона, третирана с Fotosan и облъчване, 7 ден (оцветяване HE, увеличение x 10)

Легенда: 1 – Киста; 2 – Задебелена стена на киста с излив на левкоцити

III. Сравняване на трите ФС

За проверка на статистическите хипотези е използван точен тест на Фишер (Fisher's Exact Test).

1. Група с облъчване

Резултатите са представени на табл. 2, 3 и 4.

Табл. 2. Сравняване на ФС по признак „хиперемия”, група с облъчване

Група с облъчване					
Време	Хиперемия	Вещества			P
		Fotosan n (%)	Ga n (%)	Zn n (%)	
1 ден	(-)	0 (0)	2 (33.3)	0 (0)	0.294
	(+)	6 (100)	4 (66.7)	6 (100)	
3 дни	(-)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	N/A
	(+)	6 (100)	6 (100)	6 (100)	
7 дни	(-)	0 (0)	1 (16.7)	1 (16.7)	1.000
	(+)	6 (100)	5 (83.3)	5 (83.3)	

При приложение на трите ФС + облъчване за трите периода на наблюдение се установява наличие на хиперемия без статистически значима разлика между групите.

Табл. 3. Сравняване на ФС по признак „оток”, група с облъчване

Група с облъчване					
Време	Оток	Вещества			P
		Fotosan n (%)	Ga n (%)	Zn n (%)	
1 ден	(-)	0 (0)	0 (0)	5 (83.3)	0.002*
	(+)	6 (100)	6 (100)	1 (16.7)	
3 дни	(-)	0 (0)	1 (16.7)	1 (16.7)	1.000
	(+)	6 (100)	5 (83.3)	5 (83.3)	
7 дни	(-)	0 (0)	0 (0)	4 (66.7)	0.015*
	(+)	6 (100)	6 (100)	2 (33.3)	

*Статистически значима разлика

При приложение на трите ФС+ облъчване за трите периода на наблюдение се установява наличие на оток, като статистически значима разлика е отчетена при групите на 1 и 7 ден. Най-слабо изразен е отокът при групата третирана с ZnPc.

Табл. 4. Сравняване на ФС по признак „възпаление”, група с облъчване

Група с облъчване					
Време	Форма на възпаление	Вещества			P
		Fotosan n (%)	Ga n (%)	Zn n (%)	
1 ден	Лека	0 (0)	1 (16.7)	1 (16.7)	0.100
	Умерена	1 (16.7)	4 (66.7)	4 (66.7)	
	Тежка	5 (83.3)	1 (16.7)	1 (16.7)	
3 дни	Лека	0 (0)	0 (0)	1 (16.7)	0.064
	Умерена	1 (16.7)	5 (83.3)	1 (16.7)	
	Тежка	5 (83.3)	1 (16.7)	4 (66.7)	
7 дни	Лека	0 (0)	0 (0)	4 (66.7)	0.000*
	Умерена	1 (16.7)	6 (100)	2 (33.3)	
	Тежка	5 (83.3)	0 (0)	0 (0)	

*Статистически значима разлика

При приложение на трите ФС + облъчване за трите периода на наблюдение се установява наличие на възпалителна реакция, като статистически значима разлика е отчетена при групите на 7 ден. В групата на Fotosan се отчита „тежка” възпалителна реакция, в групата на GaPc – „умерена”, а в групата, третирана с ZnPc, преобладава „лека” възпалителна реакция на 7 ден.

2. Група без облъчване

Резултатите са представени на табл. 5, 6 и 7.

Табл. 5. Сравняване на ФС по признак „хиперемия”, група без облъчване

Група без облъчване					
Време	Хиперемия	Вещества			P
		Fotosan n (%)	Ga n (%)	Zn n (%)	
1 ден	(-)	0 (0)	5 (83.3)	1 (16.7)	0.012*
	(+)	6 (100)	1 (16.7)	5 (83.3)	
3 дни	(-)	1 (16.7)	1 (16.7)	0 (0)	1.000
	(+)	5 (83.3)	5 (83.3)	6 (100)	
7 дни	(-)	2 (33.3)	2 (33.3)	2 (33.3)	1.000
	(+)	4 (66.7)	4 (66.7)	4 (66.7)	

*Статистически значима разлика

При приложение на трите ФС без облъчване за трите периода на наблюдение се установява наличие на хиперемия, като статистически значима разлика се установява между групите на 1 ден. Най-слабо изразена е хиперемията в групата, третирана с GaPc на 1 ден.

Табл. 6. Сравняване на ФС по признак „оток”, група без облъчване

Група без облъчване					
Време	Оток	Вещества			P
		Fotosan n (%)	Ga n (%)	Zn n (%)	
1 ден	(-)	1 (16.7)	1 (16.7)	5 (83.3)	0.038*
	(+)	5 (83.3)	5 (83.3)	1 (16.7)	
3 дни	(-)	0 (0)	5 (83.3)	2 (33.3)	0.018*
	(+)	6 (100)	1 (16.7)	4 (66.7)	
7 дни	(-)	6 (100)	1 (16.7)	5 (83.3)	0.012*
	(+)	0 (0)	5 (83.3)	1 (16.7)	

*Статистически значима разлика

При приложение на трите ФС без облъчване за трите периода на наблюдение се установява наличие на оток и статистически значима разлика при всички групи.

Най-слабо изразен е отокът на 1 ден в групата, третирана с ZnPc, на 3 ден – в групата, третирана с GaPc, а на 7 ден в групата, третирана с Fotosan, не се установява наличие на оток.

Табл. 7. Сравняване на ФС по признак „възпаление”, група без облъчване

Група без облъчване					
Време	Форма на възпаление	Вещества			P
		Fotosan n (%)	Ga n (%)	Zn n (%)	
1 ден	Лека	1 (16.7)	5 (83.3)	5 (83.3)	0.038*
	Умерена	5 (83.3)	1 (16.7)	1 (16.7)	
3 дни	Лека	1 (16.7)	5 (83.3)	2 (33.3)	0.110
	Умерена	5 (83.3)	1 (16.7)	4 (66.7)	
7 дни	Лека	5 (83.3)	5 (83.3)	5 (83.3)	1.000
	Умерена	1 (16.7)	1 (16.7)	1 (16.7)	

*Статистически значима разлика

При приложение на трите ФС без облъчване за трите периода на наблюдение се установява наличие на възпалителна реакция, като статистически значима разлика е отчетена при групите на 1 ден. В групата, третирана с Fotosan, се отчита „умерена” възпалителна реакция, докато в другите две групи реакцията е „лека” на 1 ден. На 7 ден при всички групи преобладава „лека” форма на възпаление.

В нито една от групите за трите периода на наблюдение не е отчетена „тежка” възпалителна реакция.

3. Контролна група

Резултатите са представени на табл. 8, 9 и 10.

Табл. 8. Сравняване на ФС по признак „хиперемия”, контролна група

Контролна група					
Време	Хиперемия	Вещества			P
		Fotosan n (%)	Ga n (%)	Zn n (%)	
1 ден	(-)	5 (83.3)	6 (100)	6 (100)	1.000
	(+)	1 (16.7)	0 (0)	0 (0)	
3 дни	(-)	5 (83.3)	6 (100)	6 (100)	1.000
	(+)	1 (16.7)	0 (0)	0 (0)	
7 дни	(-)	5 (83.3)	6 (100)	6 (100)	1.000
	(+)	1 (16.7)	0 (0)	0 (0)	

Табл. 9. Сравняване на ФС по признак “оток”, контролна група

Контролна група					
Време	Оток	Вещества			P
		Fotosan n (%)	Ga n (%)	Zn n (%)	
1 ден	(-)	5 (83.3)	6 (100)	6 (100)	1.000
	(+)	1 (16.7)	0 (0)	0 (0)	
3 дни	(-)	5 (83.3)	6 (100)	6 (100)	1.000
	(+)	1 (16.7)	0 (0)	0 (0)	
7 дни	(-)	6 (100)	6 (100)	6 (100)	N/A
	(+)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	

Табл. 10. Сравняване на ФС по признак „възпаление”, контролна група

Контролна група					
Време	Форма на възпаление	Вещества			P
		Fotosan n (%)	Ga n (%)	Zn n (%)	
1 ден	He	5 (83.3)	6 (100)	6 (100)	1.000
	Лека	1 (16.7)	0 (0)	0 (0)	
3 дни	He	5 (83.3)	6 (100)	6 (100)	1.000
	Лека	1 (16.7)	0 (0)	0 (0)	
7 дни	He	6 (100)	6 (100)	6 (100)	N/A

В контролните групи за трите периода на наблюдение и по трите изследвани признака не се установява статистически значима разлика.

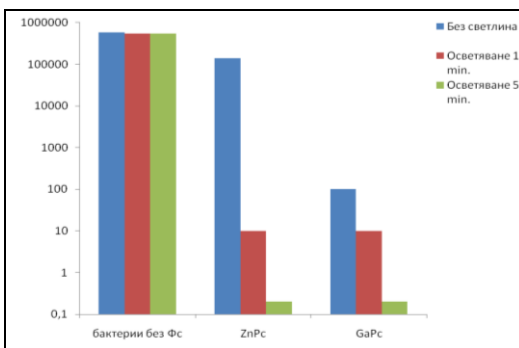
По задача № 4. Изследване на антимикробната активност на ФАД върху референтни бактериални щамове (*S. mutans*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *C. albicans*)

Резултатите са представени в брой колонии на ml (cfu/ml).

1. *S. mutans*

1.1. Водноразтворими, катионни металфталоцианинови комплекси – ZnPc и GaPc

Резултатите са представени на фиг. 11.



Фиг. 11. Преживяемост на *S. mutans* при ФАД с металфталоцианини

– Контролни проби

Установява се пренебрежимо ниска тъмнинна токсичност при използваните концентрации на ZnPc (<0.5 log намаление на жизнеспособните клетки). Пробите с GaPc показват висока тъмнинна токсичност при използваните концентрации (>3 log намаление на жизнеспособните клетки). Установява се пренебрежимо ниска светлинна токсичност.

– Проби с ФС и облъчване

Пробите с ZnPc и GaPc показват силно изразен антибактериален ефект върху *Streptococcus mutans* с незначителни разлики при двата тествани ФС. При облъчване 1 min броят на живите микроорганизми намалява от 10^6 до 10^1 (5 порядъка), а при облъчване 5 min ефектът и при двата ФС е максимален – няма живи микроорганизми.

1.2. Фотосан (FotoSan, Agent High)

Резултатите са представени на табл. 11.

Табл. 11. Ефективност на ФАД с Фотосан върху *S. mutans*

Проби \ Осветяване	Брой преживели бактерии (cfu/ml)		
	\bar{X} средно \pm SD		
	Без светлина	1 минута	5 минути
<i>S. mutans</i>	$(2.10 \pm 0.43) \times 10^5$	$(2.44 \pm 0.28) \times 10^5$ p = 0.32	$(1.51 \pm 0.30) \times 10^5$ p = 0.13
<i>S. mutans</i> +44.3 μ M Фотосан (1:6)	$(1.56 \pm 0.38) \times 10^5$	$(5.3 \pm 2.3) \times 10^1$ p = 0.002*	0 p = 0.002*
<i>S. mutans</i> + 88.6 μ M Фотосан (1:3)	$(1.40 \pm 0.56) \times 10^5$	0 p = 0.01*	0 p = 0.01*

*Статистически значима разлика

– Контролни проби

Установява се незначителна тъмнинна токсичност при използваните концентрации на ФС. Отчетената светлинна токсичност е пренебрежимо ниска.

– Проби с Фотосан (1:6) и облъчване

а) Облъчване 1 min – статистически значимо намаляване на живите микроорганизми от 10^5 до 10^1 (почти 4 порядъка).

б) Облъчване 5 min – не се установява наличие на живи микроорганизми. Ефектът на фотосенсибилизатора е максимален.

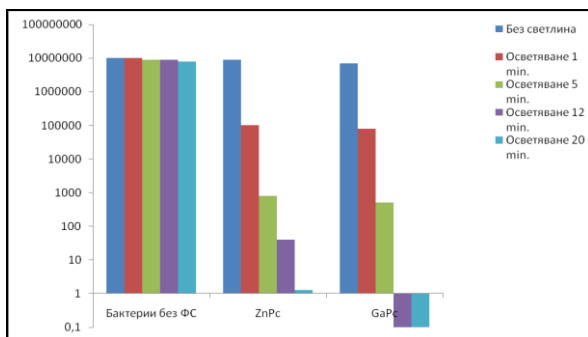
– **Проби с Фотосан (1:3) и облъчване**

а) Облъчване 1 min и 5 min – не се установява наличие на живи микроорганизми. Ефектът на фотосенсибилизатора е максимален.

2. MRSA

2.1. Водноразтворими, катионни металфталоцианинови комплекси – ZnPc и GaPc

Резултатите са представени на фиг. 12.



Фиг. 12. Преживяемост на MRSA при ФАД с металфталоцианини

– **Контролни проби**

Установява се незначителна тъмнинна токсичност при използваните концентрации на ФС. Отчетената светлинна токсичност е пренебрежимо ниска.

– **Проби с ФС и облъчване**

При приложение на ZnPc се установява добър фотодинамичен ефект, по-добре изразен след 5 min на облъчването. На 12 min се установява значителна редукция на жизнеспособните микроорганизми (с 6 порядъка от изходните стойности), а на 20 min живите микроорганизми са само 1.3 cfu/ml – постигнато е почти пълно унищожаване на бактериите.

Фотодинамичният ефект на GaPc срещу MRSA е по-силно изразен от този на ZnPc. На 5 min от облъчването се установява

значителна редуция на живите микроорганизми (с 6 порядъка от изходните стойности), а на 12 и 20 min не се установява наличие на живи микроорганизми – ефектът на фотосенсибилизатора е максимален.

2.2. Фотосан (FotoSan, Agent High)

Резултатите са представени на табл. 12.

Табл. 12. Ефективност на ФАД с Фотосан върху MRSA

Осветяване Проби	Брой преживели бактерии (cfu/ml) \bar{X} средно \pm SD		
	Без светлина	1 минута	5 минути
MRSA	$(1.18 \pm 0.44) \times 10^5$	$(1.12 \pm 0.43) \times 10^5$ p=0.86	$(0.97 \pm 0.19) \times 10^5$ p=0.49
MRSA + 44.3 μ M Фотосан (1:6)	$(1.33 \pm 0.24) \times 10^5$	$(1.33 \pm 0.92) \times 10^2$ p=0.0007*	0 p=0.0007*
MRSA + 88.6 μ M Фотосан (1:3)	$(1.46 \pm 0.56) \times 10^5$	0 p=0.01*	0 p=0.01*

*Статистически значима разлика

– Контролни проби

Установява се незначителна тъмнинна токсичност при използваните концентрации на ФС. Отчетената светлинна токсичност е пренебрежимо ниска.

– Проби с Фотосан (1:6) и облъчване

а) Облъчване 1 min – статистически значимо намаляване на живите микроорганизми от 10^5 до 10^2 (3 порядъка).

б) Облъчване 5 min – не се установява наличие на живи микроорганизми. Ефектът на фотосенсибилизатора е максимален.

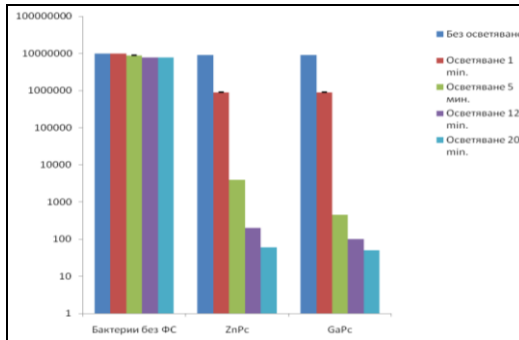
– Проби с Фотосан (1:3) и облъчване

а) Облъчване 1 min и 5 min – не се установява наличие на живи микроорганизми. Ефектът на фотосенсибилизатора е максимален.

3. E. faecalis

3.1. Водноразтворими, катионни металфталоцианинови комплекси – ZnPc и GaPc

Резултатите са представени на фиг. 13.



Фиг. 13. Преживяемост на *E. faecalis* при ФАД с металфталоцианини

– Контролни проби

Установява се незначителна тъмнинна токсичност при използваните концентрации на ФС. Отчетената светлинна токсичност е пренебрежимо ниска.

– Проби с ФС и облъчване

При приложение на ZnPs по-значителна редукция на живите микроорганизми се установява на 5 min от облъчването. На 12 min броят на жизнеспособните микроорганизми намалява с 5 порядъка от изходните стойности, а на 20 min живите микроорганизми са 60 cfu/ml – постигнато е значително унищожаване на жизнеспособните бактерии.

Фотодинамичният ефект на GaPs срещу *E. faecalis* е незначително по-силно изразен от този на ZnPs. На 5 min и 12 min от облъчването се установява редукция на живите микроорганизми с 5 порядъка от изходните стойности, а на 20 min броят на жизнеспособните бактерии е 50 cfu/ml – постигнато е значително, но не пълно унищожаване на жизнеспособните бактерии.

3.2. Фотосан (FotoSan, Agent High)

Резултатите са представени на табл. 13.

Табл. 13. Ефективност на ФАД с Фотосан върху *E. faecalis*

Осветяване Проби	Брой преживели бактерии (cfu/ml) \bar{x} средно \pm SD		
	Без светлина	1 минута	5 минути
<i>E. faecalis</i>	$(1.36 \pm 0.31) \times 10^5$	$(1.36 \pm 0.39) \times 10^5$ p=0.98	$(1.14 \pm 0.30) \times 10^5$ p=0.43
<i>E. faecalis</i> + 44.3 μ M Фотосан (1:6)	$(2.10 \pm 0.34) \times 10^5$	$(5.46 \pm 1.50) \times 10^4$ p=0.002*	0 p=0.0004*
<i>E. faecalis</i> + 88.6 μ M Фотосан (1:3)	$(1.38 \pm 0.52) \times 10^5$	$(4.50 \pm 0.95) \times 10^4$ p=0.03*	0 p=0.01*

*Статистически значима разлика

– Контролни проби

Установява се незначителна тъмнинна токсичност при използваните концентрации на ФС. Отчетената светлинна токсичност е пренебрежимо ниска.

– Проби с Фотосан (1:6) и облъчване

а) Облъчване 1 min – статистически значимо намаляване на живите микроорганизми от 10^5 до 10^4 (почти 1 порядък).

б) Облъчване 5 min – не се установява наличие на живи микроорганизми. Ефектът на фотосенсибилизатора е максимален.

– Проби с Фотосан (1:3) и облъчване

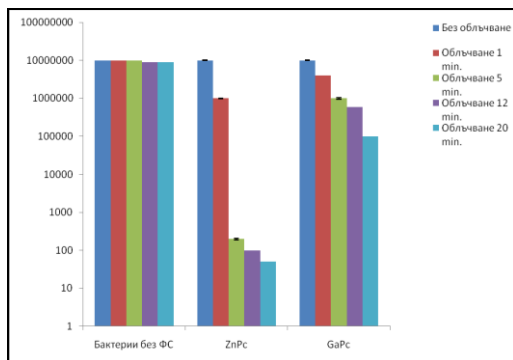
а) Облъчване 1 min – статистически значимо намаляване на живите микроорганизми от 10^5 до 10^4 (почти 1 порядък).

б) Облъчване 5 min – не се установява наличие на живи микроорганизми. Ефектът на фотосенсибилизатора е максимален.

4. *C. albicans*

4.1. Водноразтворими, катионни металфталоцианинови комплекси- ZnPc и GaPc

Резултатите са представени на фиг. 14.



Фиг. 14. Преживяемост на *C. albicans* при ФАД с металфталоцианини

– Контролни проби

Установява се незначителна тъмнинна токсичност при използваните концентрации на ФС. Отчетената светлинна токсичност е пренебрежимо ниска.

– Проби с ФС и облъчване

Фотодинамичният ефект на ZnPs срещу *C. albicans* е значително по-силно изразен от този на GaPs. На 1 min от облъчването на суспензия от гъбички и ZnPs броят на жизнеспособните микроорганизми намалява незначително – с 1 порядък от изходните стойности. На 5 min от облъчването микробното число се редуцира значително – с 5 порядъка от изходните стойности. До 20 min се отчита намаляване на броя на живите микроорганизми с още 0.5 log.

При приложение на GaPs до 12 min редукцията на живите микроорганизми е слаба – около 1 порядък от изходните стойности. На 20 min от облъчването броят на жизнеспособните микроорганизми намалява до 10⁵ с 2 порядъка от изходните стойности.

4.2. Фотосан (FotoSan, Agent High)

Резултатите са представени на табл. 14.

Табл. 14. Ефективност на ФАД с Фотосан върху *S. albicans*

Осветяване Проби	Брой преживели бактерии (cfu/ml) \bar{X} средно \pm SD		
	Без светлина	1 минута	5 минути
<i>S. albicans</i>	$(1.91 \pm 0.30) \times 10^5$	$(1.73 \pm 0.29) \times 10^5$ p=0.49	$(1.43 \pm 0.24) \times 10^5$ p=0.09
<i>S. albicans</i> + 44.3 μM Фотосан (1:6)	$(2.84 \pm 0.93) \times 10^5$	$(3.92 \pm 0.43) \times 10^5$ p=0.14	$(3.11 \pm 0.45) \times 10^5$ p=0.6
<i>S. albicans</i> + 88.6 μM Фотосан (1:4)	$(2.24 \pm 1.89) \times 10^5$	$(9.73 \pm 2.41) \times 10^4$ p=0.31	$(7.86 \pm 0.61) \times 10^4$ p=0.25

– **Контролни проби**

Установява се незначителна тъмнинна токсичност при използваните концентрации на ФС. Отчетената светлинна токсичност е пренебрежимо ниска.

– **Проби с Фотосан (1:6) и облъчване**

а) При облъчване 1 min и 5 min – минимален антигъбичен ефект (живите микроорганизми са от порядъка на 10^5). Липсва статистически значима разлика.

– **Проби с Фотосан (1:3) и облъчване**

а) Облъчване 1 min и 5 min – слаб антигъбичен ефект (живите микроорганизми намаляват с по-малко от 1 порядък). Липсва статистически значима разлика.

5. По задача № 5. In vitro изследване на температурните промени при кавитетна препарация с високоенергиен Er:YAG лазер

Измерените минимална, средна и максимална температура на образците при кавитетна препарация с високоенергиен Er:YAG лазер са представени на табл. 15.

Табл. 15. Температура в кавитета по време на лазерна подготовка (n=26)

Измерване \ t°C	Средна за измерването			Максимална за измерването			Минимална за измерването		
	n	\bar{x}	SD	n	\bar{x}	SD	n	\bar{x}	SD
I	26	21.2	0.96	26	23.54	1.51	26	20.51	1.27
II	26	19.41	0.89	26	22.31	1.64	26	18.04	0.92
III	26	19.47	0.42	26	22.28	1.86	26	17.87	0.67
IV	26	19.24	0.41	26	22.54	1.81	26	17.58	0.85

Термографското изследване показва, че измерените температурни стойности при IV измерване (на 42 sec от началото на кавитетната подготовка) винаги са по-ниски от изходните (преди началото на кавитетната подготовка).

На табл. 16. е представена динамиката на температурните промени по време на лазерна кавитетната подготовка с Er:YAG лазер.

Табл. 16. Динамика на температурата по време на кавитетната подготовка (n=26)

Показател	Период от време	$\bar{X}_n - \bar{X}_{(n+1)}$	SD	(p)
Средна температура	I-II измерване	1.78	0.92	<0.001*
	II-III измерване	-0.05	0.86	0.753
	III-IV измерване	0.23	0.29	0.001*
Максимална температура	I-II измерване	1.14	1.81	0.004*
	II-III измерване	0.03	1.78	0.922
	III-IV измерване	-0.27	1.58	0.399
Минимална температура	I-II измерване	2.5	1.21	<0.001*
	II-III измерване	0.17	1.11	0.436
	III-IV измерване	0.28	0.88	0.113

*Статистически значима разлика

Средни температурни стойности

При I-то отчитане средната стойност на температурата е 21.20°C, след което се отчита значимо намаляване на температурата ($p < 0.001$). При третото измерване се регистрира незначимо повишаване на температурата и при последното отчитане се измерва значимо по-ниска температура от тази при третото отчитане ($p = 0.001$).

Максимални температурни стойности

При I-то отчитане средната стойност на максимално отчетените температури е 23.54°C, при II-то отчитане температурата се понижава значимо ($p = 0.004$), а при следващите измервания температурата се променя незначително.

Минимални температурни стойности

При I-то отчитане средната стойност на минимално отчетените температури е 20.51°C, а при II-то отчитане температурата се понижава значимо до 18.04°C ($p < 0.001$). При следващите две измервания температурата се понижава незначително.

Разликите между максималните и минималните температурни стойности са представени на табл. 17.

Табл. 17. Разпределение на температурната разлика по групи

Температура Измер- ване	<5.5°C	5.5-6.0°C	>6.0°C	(p)
I	24 (92.7%)	-	2 (7.7%)	<0.001*
II	20 (76.9%)	1 (3.8%)	5 (19.2%)	<0.001*
III	20 (76.9%)	-	6 (23.1%)	0.006*
IV	17 (65.4%)	1 (3.8%)	8 (30.8%)	0.001*

*Статистически значима разлика

Във всяко едно от четирите измервания се установява най-висок относителен дял на температурната разлика под 5.5°C. При отчитане на разликите между максимална и минимална температура и за четирите измервания не се установява

статистически достоверно повишаване на температурата над 5.5°C.

По задача № 6. Сравнително клиничко-лабораторно изследване на антимикробната активност на ФАД, конвенционални препарати и Er:YAG лазер върху микроорганизми, изолирани от дълбоки кариозни лезии

Резултатите от микробиологичните проби от кавитетите преди и след ФАД са представени на табл. 18.

Всички изолирани бактерии са аеробни и факултативно анаеробни.

В 82.35% от случаите (14 от 17 случая) след третирането с ФС бактериалната инфекция е елиминирана напълно.

В 17.65% (3 от 17 случая) е установено намаляване на бактериалното число от 100 до 1000 пъти.

Статистическият анализ е направен с непараметричен тест на McNemar. Резултатите показват сигнификантно по-висок процент случаи с наличие на бактериална елиминация след ФАД ($p < 0.001$).

Резултатите от микробиологичните проби от кавитетите преди и след третиране с Тубулицид са представени на табл. 19.

Всички изолирани бактерии са аеробни и факултативно анаеробни.

В 80% от случаите (12 от 15 случая) след третирането с Тубулицид бактериалната инфекция е елиминирана напълно.

В 20% (3 от 15 случая) е установено намаляване на бактериалното число от 10 до 10 000 пъти.

Статистическият анализ е направен с непараметричен тест на McNemar. Резултатите показват сигнификантно по-висок процент случаи с наличие на бактериална елиминация след третиране на кавитетите с Tubulicid ($p = 0.001$).

Табл. 18. Микробни изолати от дълбоки кариозни лезии, преди и след ФАД

Група Проба №	Група I.1. (дестилирана вода)	Група I.2. (ФАД)
1.	<i>Staphylococcus aureus</i> 10 000 cfu/ml	-
2.	-	-
3.	<i>Streptococcus mitis</i> 100 000 cfu/ml	-
4.	<i>Staphylococcus aureus</i> 1000 cfu/ml <i>Actinomyces newii anitratus</i> 10 000 cfu/ml	-
5.	<i>Streptococcus anginosus</i> 10 000 000 cfu/ml	<i>Streptococcus anginosus</i> 10 000 cfu/ml
6.	<i>Enterobacter cloaceae</i> 10 000 000 cfu/ml <i>Streptococcus mitis</i> 100 000 cfu/ml <i>Enterococcus faecalis</i> 10 000 cfu/ml	<i>Enterobacter cloaceae</i> 10 000 cfu/ml <i>Streptococcus mitis</i> 1000 cfu/ml
7.	<i>Streptococcus mutans</i> 10 000 cfu/ml	-
8.	<i>Streptococcus intermedius</i> 10 000 cfu/ml	-
9.	<i>Bacillus brevis</i> 100 000 cfu/ml <i>Streptococcus mitis</i> 10 000 cfu/ml	<i>Bacillus brevis</i> 100 cfu/ml
10.	<i>Streptococcus mutans</i> 100 000 cfu/ml	-
11.	<i>Enterobacter cloaceae</i> 10 000 cfu/ml	-
12.	<i>Streptococcus gordonii</i> 100 000 cfu/ml <i>Neisseria subflava</i> 10 000 cfu/ml	-
13.	<i>Streptococcus mitis</i> 100 000 cfu/ml <i>Haemophilus parainfluenzae</i> 10 000 cfu/ml	-
14.	-	-
15.	<i>Streptococcus mutans</i> 100 000 cfu/ml	-
16.	<i>Corynebacterium xerosis</i> 10 000 cfu/ml <i>Streptococcus mitis</i> 100 000 cfu/ml	-
17.	<i>Staphylococcus aureus</i> 10 000 cfu/ml	-
18.	<i>Streptococcus mitis</i> 100 000 cfu/ml	-
19.	<i>Streptococcus intermedius</i> 10 000 cfu/ml <i>Neisseria polysacharea</i> 10 000 cfu/ml	-
20.	-	-

Табл. 19. Микробни изолати от дълбоки кариозни лезии преди и след третиране с Тубулицид

Група Проба №	Група П.1. (дестилирана вода)	Група П.2. (Тубулицид)
1.	<i>Streptococcus gordonii</i> 1000 cfu/ml	-
2.	<i>Staphylococcus aureus</i> 100 000 cfu/ml	<i>Staphylococcus aureus</i> 1000 cfu/ml
3.	<i>Enterococcus faecalis</i> 10 000cfu/ml	-
4.	<i>Enterococcus faecalis</i> 100 000 cfu/ml	-
5.	<i>Kingella kingae</i> 100 000 cfu/ml <i>Streptococcus intermedius</i> 10 000 cfu/ml	-
6.	<i>Enterococcus faecalis</i> 100 000 cfu/ml	-
7.	<i>Enterobacter cloacae</i> 10 000 cfu/ml	-
8.	<i>Streptococcus intermedius</i> 100 000 cfu/ml	-
9.	<i>Streptococcus mitis</i> 1 000 000 cfu/ml <i>S. salivarius</i> 10 000 cfu/ml	<i>Streptococcus mitis</i> 100 cfu/ml
10.	<i>Streptococcus parasanguis</i> 1 000 000 cfu/ml <i>Actinomyces pyogenes</i> 100 000 cfu/ml	-
11.	<i>Streptococcus gordonii</i> 1 000 000 cfu/ml <i>Bacillus brevis</i> 100 000 cfu/ml	-
12.	<i>Streptococcus mutans</i> 100 000 cfu/ml <i>Lactobacillus acidophilus</i> 100 000 cfu/ml	-
13.	<i>Streptococcus parasanguis</i> 100 000 cfu/ml <i>Actinomyces viscosus</i> 10 000 cfu/ml	-
14.	<i>Streptococcus gordonii</i> 100 000 cfu/ml <i>Enterococcus faecalis</i> 10 000 cfu/ml <i>S. mitis</i> 1000 cfu/ml	<i>S. mitis</i> 100 cfu/ml
15.	<i>Streptococcus mutans</i> 10 000 cfu/ml	-

Резултатите от микробиологичните проби от кавитетите, препарирани с Er:YAG лазер, са представени на табл. 20.

Табл. 20. Микробни изолати от дълбоки кариозни лезии, третирани с Er:YAG лазер

Група Проба №	Група III.1. (Er:YAG лазер)
1.	<i>Enterobacter cloacae</i> 10 000 cfu/ml
2.	<i>Staphylococcus aureus</i> 10 000 cfu/ml
3.	-
4.	<i>Corinebacterium pseudodiphtheriticum</i> 10 000 cfu/ml <i>Streptococcus mitis</i> 10 000 cfu/ml
5.	-
6.	<i>Corinebacterium pseudodiphtheriticum</i> 10 000 cfu/ml <i>Streptococcus mitis</i> 10 000 cfu/ml
7.	-
8.	<i>Streptococcus salivarius</i> 1000 cfu/ml
9.	<i>Enterococcus faecalis</i> 10 000 cfu/ml
10.	-
11.	-
12.	<i>Streptococcus mutans</i> 10 000 cfu/ml
13.	<i>Streptococcus constellatus</i> 10 000 cfu/ml
14.	-
15.	-

Всички изолирани бактерии са аеробни и факултативно анаеробни.

В 46.67% от случаите (7 от 15 случая) след кавитетна подготовка с Er: YAG лазер бактериалната инфекция е елиминирана напълно.

В 53.33% (8 от 15 случая) е установено наличие на микроорганизми, като бактериалното число е не по-високо от 10 000 cfu/ml.

Статистическият анализ е направен с непараметричен тест на McNemar. Резултатите показват, че след кавитетна подготовка

с Ег: YAG лазер се установява статистически значимо намаляване на микроорганизмите ($p=0.016$).

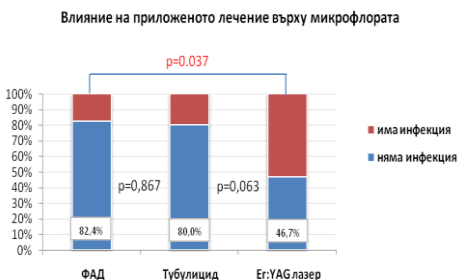
И при трите използвани в настоящото изследване антибактериални способа (ФАД, Тубулицид, Ег:YAG лазер) е установен сигнификантно по-висок процент случаи на бактериална елиминация след третиране на кавитетите (табл. 21).

Табл. 21. Сравнение на антимикробния ефект на ФАД, Тубулицид и Ег:YAG лазер

Ефект след лечение Група	Няма инфекция бр./%	Има инфекция бр./%	Общо бр./%	(p)
Фотоактивирана дезинфекция	14 (82.4%)	3 (17.6%)	17 (100%)	<0.001*
Тубулицид	12 (80.0%)	3 (20.0%)	15 (100%)	0.001*
Лазер	7 (46.7%)	8 (53.3%)	15 (100%)	0.016*
(p)	0.057			

*Статистически значима разлика

За статистическия анализ е използван и непараметричният тест на Kruskal–Wallis. Тествана е хипотезата има ли разлика в разпределението на кавитетите с и без изолирана микробна флора в зависимост от начина им на третиране (фиг. 15).



Фиг. 15. Ефект на ФАД, Тубулицид и Ег:YAG лазер спрямо микроорганизми, изолирани от дълбоки кариозни лезии

Установява се статистически значима разлика в относителния дял на кавитетите с остатъчна инфекция между групите, третирани с ФАД и Ег:YAG лазер.

V. О Б С Ъ Ж Д А Н Е

1. По задача № 1

***In vitro* изследване за цитотоксичност на различни фотосенсибилизатори (Zn-съдържащи ФС, GaPc, Fotosan) върху клетъчни култури от ембрионални фибробласти от мишка**

Сравнителните изследвания върху цитотоксичност на различни видове фотосенсибилизатори са от изключително значение при оценката на възможностите за тяхното клинично приложение, наред с изследванията за биосъвместимост върху опитни животни. Желателно е използваните като ФС субстанции да имат малка или да нямат тъмнинна цитотоксичност. Някои химикали, които не са токсични, могат да станат такива при излагане на светлина, което да отключи нежелан биологичен страничен ефект.

Използваният в изследването Balb/c 3T3 Neutral Red-тест се прилага от 2000 г. за определяне на акутна директна цитотоксичност. Тя се изчислява чрез спектрофотометрия, която отчита инхибиране на възможността на клетъчните култури да поемат оцветител – неутрално червено след третиране.

При анализа на резултатите от настоящото изследване се установява незначителна или липсваща тъмнинна цитотоксичност след прилагане на Zn-съдържащи ФС в широк диапазон концентрации. Липсата на цитотоксичност на Zn-съдържащи ФС е доказана и в изследванията на Segalla и кол. (2002), Giuliani и кол. (2010) и др.

След облъчване с лазер с $\lambda = 635 \text{ nm}$ е доказана дозозависима цитотоксична активност на Zn-съдържащите съединения α , β и ZnPc. Резултатите корелират с тези, получени от други изследователи – Chan и кол. (1987) и Liu и кол. (2013).

Най-ниската токсична доза, при която се установява статистически значима разлика, за ФС α и ZnPs е 1 μM , докато за β е 4 μM . Цитотоксичност под 50% се установява за ФС α при концентрация под 4 μM , за ZnPs – под 2 μM , и за β – при всички изследвани концентрации.

Изследваният GaPs показва наличие на тъмнинна токсичност при две от приложените концентрации (8 и 10 μM), както и изразен цитотоксичен ефект след облъчване с лазер с $\lambda=635\text{ nm}$ при всички изследвани концентрации (от 10 до 0.125 μM). Тези резултати са в съответствие с изследванията на Mantareva и кол. (2011). **Получените данни предполагат позадълбочени проучвания на GaPs преди прилагане в клиничната практика.**

Цитотоксичност под 50% е установена след прилагането на ФС GaPs и Fotosan (Agent High) при всички изследвани концентрации след облъчване със специфичен източник на светлина.

Фотосенсибилизатор Fotosan (Agent High) показва отсъствие на тъмнинна токсичност, както и липса на статистически значима цитотоксичност след облъчване с лазер с $\lambda=635\text{ nm}$ при всички изследвани концентрации (от 10 до 0.125 μM). Резултатите потвърждават получените от Gambarini и кол. (2011). Липсата на тъмнинна токсичност при толуидиново синьо е доказана и от Zanin и кол. (2005), Fekrazada и кол. (2013), Necker и кол. (2013) и Nakimina и кол. (2014). Данните са в противоречие с изследванията на Giusti и кол. (2008), които установяват наличие на тъмнинна цитотоксичност на толуидиновото синьо, която се увеличава с увеличаване на концентрацията му. **Резултатите от настоящото изследване дават основание да се заключи, че препаратът Fotosan (Agent High) не е токсичен за**

съединително-тъканните елементи (ембрионални фибробласти от мишка) *in vitro*.

2. По задача № 2

***In vitro* изследване за фототоксичност на лазерно лъчение с различни дължини на вълната (Er:YAG, Nd:YAG и диоден лазер) върху клетъчни култури от ембрионални фибробласти от мишка**

Ефектът на лазерното лъчение върху тъканите зависи от абсорбираната светлинна енергия, която се определя от параметрите на лазерното лъчение и оптичните характеристики на тъканта, характеризираща се с индивидуална трансlucentност. Редица изследвания доказват наличие на биостимулиращ ефект на лазерната светлина върху клетъчната пролиферация. При предозиране на лазерното лъчение обаче ефектът би могъл да е обратен. Ето защо сравнителните изследвания върху фототоксичност на различни източници на лазерна светлина спрямо клетъчни линии са от изключително значение при оценката на възможностите за тяхното клинично приложение.

За оценка на резултатите в настоящото изследване е използван Valb/c 3T3 Neutral Red-тест. Данните показват, че облъчването с изследваните лазерни системи ($\lambda=665$ nm, 1064 nm и 2940 nm) през дентинни шлифове с дебелина от 1 mm не предизвиква статистически значим цитотоксичен ефект върху клетъчни култури от ембрионални фибробласти от мишка при използваните параметри на облъчване. Резултатите от нашите изследвания за диодния лазер съвпадат с тези, получени от Zanin и кол. (2006), Guiliani и кол. (2010), Fekrazada и кол. (2013), Nakimina и кол. (2014) и др. Изследвания за фототоксичност на Nd:YAG и Er:YAG лазер не бяха открити в литературата, което съвпада с обобщението при прегледа на литературни източници на Kerstein и кол. (2014). Takamori и кол. (2000) и Todea и кол. (2008) доказват стимулиращо въздействие на Er:YAG и Nd:YAG

лазерно лъчение върху оздравителните процеси в зъбните тъкани. Установена е ускорена пролиферация на фибробласти, образуване на по-голямо количество репаративен дентин и ускоряване на оздравителните процеси. Тези данни индиректно подкрепят доказаната от нас липса на фототоксичност.

В настоящото изследване в нито една от изследваните групи не е установена фототоксичност над 50%. И при трите лазерни системи се доказва нарастване на фототоксичния ефект с увеличаване на времето на облъчване.

3. По задача № 3

***In vivo* изследване на биологичната поносимост (цитотоксичност и фототоксичност) на ФС и лазерно лъчение върху опитни животни**

Сравнителните изследвания върху биологичната поносимост на различни видове фотосенсибилизатори са от изключително значение при оценка на възможностите за тяхното клинично приложение. Препаратите, влизащи в контакт с тъканите, не трябва да предизвикват токсични или алергични реакции. Някои безвредни вещества могат да станат токсични при излагане на светлина, което да отключи нежелан биологичен страничен ефект. Ето защо в настоящия експеримент е изследвана цитотоксичност на три различни групи ФС, приложени самостоятелно и при облъчване с лазерна светлина, както и фототоксичност на използвания светлинен източник.

Макроскопското и хистоморфологичното сравнително изследване показва добра биологична поносимост на подкожната съединителна тъкан на експерименталните животни спрямо изследваните ФС (ZnPc, GaPc и Fotosan, Agent High).

При макроскопския оглед на препаратите не се установяват различия по отношение на третирани и нетретирани с лазер зони.

При микроскопското изследване в групата на контролните животни и при трите експериментални срока за наблюдение не се установяват статистически значими патологични отклонения.

Проведените изследвания показват, че приложени субкутанно, новосинтезираните фотосенсибилизатори ZnPc и GaPc в концентрации $c=10 \mu\text{mol}$ не предизвикват остра тъканна реакция, както и прояви на алергична реакция. Описаните хистологични изменения представляват по същество иритативни промени. По-изразените изменения в групите с ФС с облъчване се дължат най-вероятно на излъчените кислородни радикали и синглетен кислород в субкутанната среда, или на леко повишаване на температурата в зоната на лазерното петно. Резултатите от нашите изследвания потвърждават данните на други изследователи, които доказват биологичната поносимост на Zn- и Ga-съдържащи ФС.

При животните, третирани с Fotosan, микроскопските промени в тъканите са най-силно изразени. Предполагаме, че описаните по-тежки изменения при групата на животните, третирани с Fotosan, се дължат на високия вискозитет на приложеното вещество (съдържа глицерин и ксантен). Значение има вероятно и по-големият лумен на иглите за неговото субкутанно инжектиране. Това предположение се подкрепя от факта, че единствено в тази контролна група се установяват изменения по изследваните показатели. Giusti и кол. (2008) пък доказват наличие на тъмнинна цитотоксичност на толуидиново синьо, която се увеличава с увеличаване на концентрацията му.

Изследването на новите фталоцианинови ФС, сравнени с разрешения за клинична употреба препарат Фотосан, показва, че при използваните концентрации те не предизвикват значими реакции в тъканите. Установената добра биологична поносимост доказва, че могат да бъдат прилагани безопасно в изследваните концентрации след като бъдат сертифицирани и разрешени за клинична употреба в ИАЛ.

4. По задача № 4

Изследване на антимикробната активност на ФАД върху референтни бактериални щамове (*S. mutans*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *C. albicans*)

Нарастващата бактериална резистентност налага един различен подход към устойчивите одонтогенни, в частност кариогенни микроорганизми. Алтернативен начин е въвеждането на ФДТ при превенцията, контрола и лечението на зъбния кариес. ФАД притежава редица предимства пред конвенционалните антимикробни методи: неинвазивен, високо селективен метод, дава възможност за повторяемост, без възникване на резистентни щамове, осигурява бързо инактивиране на целевите микроорганизми, има локално приложение и ограничен ефект върху околните тъкани. Произвежданите от МО антиоксидантни ензими (супероксид дисмутаза, пероксидаза, каталаза) осигуряват на микробните клетки защита срещу някои кислородни радикали, но не и срещу синглетен кислород. Освен доказан антибактериален ефект при ФАД е установена и детоксикация и инактивиране на ендотоксини.

Антимикробната активност на ФДТ зависи от химичната структура и концентрацията на използвания ФС, характеристиките на използвания светлинен източник, както и от особеностите на микробните клетки.

Streptococcus mutans е Грам (+), факултативно анаеробен, ацидогенен и ацидуричен патоген, образуващ биофилми. Смята се за основен етиологичен фактор за развитие на зъбен кариес. Резултатите от нашите изследвания показват, че трите използвани ФС притежават силен антимикробен ефект спрямо референтен щам *Streptococcus mutans* с малки разлики между отделните подгрупи. **Максимален ефект е отчетен при всички групи с 5 min облъчване, както и при третиране на бактериалната суспензия с Fotosan (1:3) и облъчване 1 min. В**

останалите случаи се установява статистически значимо намаляване на броя на жизнеспособните микроорганизми.

Резултатите от нашите изследвания потвърждават доказанието от Lima и кол. (2009), Rolim и кол. (2012) и др. антимикуробен ефект на толуидиновото синьо (фотоактивна съставка на Fotosan). Настоящият експеримент потвърди и данните, представени от Wood и кол. (1999), относно много добрия антибактериален ефект на фталоцианинови ФС спрямо *Streptococcus mutans*.

Staphylococcus aureus е Грам (+), факултативно анаеробен, силно патогенен МО. Може да образува биофилм върху почти всички медицински приспособления. Особено устойчива е неговата метицилин-резистентна форма (MRSA). Резултатите от настоящото изследване показват добро повлияване на MRSA при фотодинамична терапия с трите изследвани вида ФС. Максимален е ефектът при приложение на Fotosan (1:3) и 1 min облъчване, Fotosan (1:6) и 5 min облъчване, както и GaPc за 12 min. Най-слабо изразен е антибактериалният ефект на ZnPc, при който не се постига пълно унищожаване на живите микроорганизми дори при облъчване 20 min. Въпреки това при приложението му е отчетено значително и статистически достоверно намаляване на микробното число спрямо изходните стойности.

Резултатите от настоящия експеримент са в корелация с данните на Wilson и кол. (1995, 1999), Kashef и кол. (2012), Yin и кол. (2013) и др., които установяват много добър антибактериален ефект спрямо MRSA при ФДТ с толуидиново синьо. Нашите изследвания потвърдиха и доказаната от Mantareva и кол. (2011), Yin и кол. (2013) и Георгиева (2015) добра антибактериална активност при използване на фталоцианинови ФС (Zn- и Ga-съдържащи ФС). Резултатите ни са в противоречие с установената от Guiliani и кол. (2010) по-висока антимикуробна активност на Zn-съдържащи ФС.

Нашият експеримент, както и аналогични изследвания, доказват, че ФАД може да бъде ефективна и спрямо резистентни на антибиотици МО.

Enterococcus faecalis е Грам (+), факултативно анаеробен, силно устойчив на антимикробна терапия патоген. Открива се при персистиращи инфекции, притежава способност за формиране на биофилми и характеристики, които му позволяват да оцелява при екстремни условия. Може да навлиза в дентиновите тубули на повече от 400 μm . Резултатите от нашето изследване показват, че *E. faecalis* се поддава по-трудно на фотодинамично третиране в сравнение с горепосочените микроорганизми. Максимален ефект е постигнат при приложение на Fotosan (и при двете изследвани концентрации) и облъчване 5 min. В останалите случаи се установява статистически значимо намаляване на броя на живите микроорганизми. **Ефектът на фталоцианините е по-слабо изразен от този на Fotosan, като по-значителна редукция на микробното число при тях се установява на 12 и 20 min. Лек превес в силата на антибактериалния ефект се отчита при GaPc.**

Резултатите от нашите изследвания потвърждават добрия антимикробен ефект на ФДТ с толуидиново синьо спрямо *E. faecalis*, доказан от Meige и кол. (2009) и Verma и кол. (2012). Necker и кол. (2013) обаче установяват по-слабо изразена антимикробна активност при облъчване 4–6 min, което противоречи на нашите резултати за максимален фотодинамичен ефект. При прилагане на фталоцианини (Zn-и Ga-съдържащи ФС) Mantareva и кол. (2011) и Георгиева (2015) установяват значително намаляване до пълна редукция на *E. faecalis* в зависимост от използваните концентрации и параметри на облъчване. **Нашето изследване потвърждава намаляването на броя на оцелелите МО с 4–5 порядъка, но 100% редукция на МО не е постигната с нито един от използваните металфталоцианинови ФС. Знае се, че *E. faecalis* произвежда**

собствени реактивни кислородни радикали, което може да обясни ограниченият ефект на ФАД спрямо него.

Candida albicans е диплоидна гъба, причинител на вътреболнични инфекции (70–90% от всички случаи на гъбични инфекции), образува биофилми върху катетри и др. медицински приспособления. Образува колонии в дентинови каналчета на невитални зъби, при подходящи условия може да образува киселини, да навлиза в дентинови каналчета при дълбоки кариозни лезии, взема участие в образуването на биофилм. Смята се, че *C. albicans* има по-скоро подпомагаща роля при развитието на зъбен кариес, въпреки че Moalic и кол. (2001) и Nikawa и кол. (2003) я посочват като вероятен причинител на заболяването. Резултатите от нашето изследване показват, че тя е най-устойчивият микроорганизъм спрямо фотодинамична терапия. С нито един от трите използвани ФС за различните периоди на облъчване не е отчетен пълен антибактериален ефект. **Най-значително намаляване на броя на жизнеспособните микроорганизми се установява при прилагане на ZnPs за 5, 12, 20 min.**

При прилагането на толуидиново синьо Gonzales и кол. (2012) и Yin и кол. (2013) установяват редукция от 3–5 порядъка до пълно унищожаване на *C. albicans*, което е в противоречие с данните, получени в нашето изследване. Други автори доказват слаб антимикуробен ефект при ФДТ с толуидиново синьо и посочват метиленовото синьо като по-ефективен ФС спрямо *C. albicans*. Demidova и кол. (2005) и Mantareva и кол. (2007) доказват, че *C. albicans* може да бъде ефективно редуцирана с Zn-съдържащ металфталоцианин само при висока концентрация на ФС (6 μM) и голяма плътност на мощността (100 mW/cm^2). Използваните параметри в нашето изследване са значително пониски, което може би е една от причините за доказания по-слаб антибактериален ефект. По-трудното унищожаване на *C. albicans* в сравнение с останалите Грам (+) микроорганизми чрез фотодинамична терапия е установено от Demidova и Hamblin

(2005). Смята се, че причината се дължи на ядрената мембрана и големия размер на клетката.

При условията на настоящото изследване използваните ФС показват различна антимикробна активност спрямо четирите микробни вида. Разликата във фоточувствителността на изследваните суспензии се дължи вероятно на различната химична структура и концентрация на ФС, на характеристиките на светлинния източник, както и на възможността за натрупването на фотосенсибилизатора в микробните клетки.

Нашите проучвания доказват, че новосинтезираните металфталоцианинови комплекси са обещаващи фотодинамични сенсибилизатори спрямо изследваните бактериални щамове. И двата ФС осигуряват значителна редукция на броя на жизнеспособните микроорганизми – с 4–5 порядъка от изходните стойности. Най-добри резултати се установяват на 12 и 20 min от облъчването, което в клинични условия би удължило лечебното време. Най-бърз антимикробен ефект е постигнат при *S. mutans* – пълно унищожаване на живите МО на 5 min.

Най-бърз и значим антимикробен ефект спрямо всички изследвани микроорганизми е установен при приложението на Fotosan. Изключение правят пробите с *C. albicans*, където най-добър антибактериален ефект показва ZnPc. Трябва да се има предвид, че в практиката Fotosan се прилага неразреден, т.е. очакваният ефект е още по-висока антимикробна активност в реални условия. По-слабо изразеният антибактериален ефект на новосинтезираните металфталоцианини може да бъде обяснен с по-ниската концентрация на използваните разтвори (1–3 μM), спрямо тази на търговския продукт Fotosan. Това е обусловено от нарастващата цитотоксичност на фталоцианините при повишаване на концентрацията им.

Анализът на данните от нашето изследване показва, че точният подбор на концентрация на ФС и светлинна доза, както и

тяхното съчетание може да доведе до пълен фотодинамичен отговор, без наличие на оцелели бактерии и нежелани странични ефекти. Необходими са допълнителни експериментални изследвания с други концентрации и светлинни източници (облъчване с няколко дължини на вълната, мощности и времетраене), за да се подберат най-ефективните параметри за един бъдещ клиничен протокол за новосинтезираните ФС.

5. По задача № 5

***In vitro* изследване на температурните промени при кавитетна препарация с високоенергиен Er:YAG лазер**

Кавитетната препарация с високоенергийни лазерни системи е съвременен и модерен алтернативен метод на лечение на зъбния кариес. Запазването на виталитета на зъбната пулпа при третиране на дълбоки кариозни лезии с Er:YAG лазер зависи от преноса на топлина през ТЗТ към нея, тъй като част от енергията на лазерното лъчение се превръща в топлинна енергия. Термичният ефект при лазерната кавитетна препарация зависи от дължината на вълната, от параметрите на облъчване, проводящата система, методиката на работа, оптичните характеристики на тъканите и от дебелината на остатъчния надпулпен дентин.

Повишаването на температурата може да доведе до постоперативна чувствителност, изгаряне на тъканите, пулпна некроза, образуване на репаративен дентин. Увреждането на тъканите зависи от достигнатите температурни стойности и продължителността на въздействие. Установено е, че повишаването на температурата с 5.5 до 6°C за по-малко от една минута, не води до необратимо увреждане на зъбната пулпа.

В настоящото изследване установените разлики между максималната и минималната отчетена температура при всички измервания не показват статистически значимо повишаване на

температурата над 5.5°C. Резултатите от нашето изследване потвърждават тези, получени от Gouw-Soares и кол. (2001), Fried и кол. (2002), Al-Batauneh и кол. (2014) и др. Ограниченото повишаване на температурата при работа с Er:YAG лазер се обяснява със селективна абсорбция на лъчението от водата в ТЗТ, с елиминиране на по-голяма част от доставената енергия чрез водната пара и висока скорост на аблация, при която много малко количество топлина има възможност да се транспортира към околните тъкани.

В литературата съществуват и данни за повишаване на температурата при лазерна кавитетна препарация над критичните за ЗП 5.5°C, което противоречи на резултатите, получени в настоящия експеримент. Трябва да се вземат под внимание обаче различните параметри на лазерното лъчение, техниката на кавитетна препарация, както и използвания метод за регистриране на температурните промени.

За отчитане на температурните промени в настоящото изследване е използвана **термовизионна диагностика** – модерен метод в съвременната медицина, позволяващ неинвазивно отчитане на температурните промени чрез регистрация на инфрачервена емисия от изследваните повърхности. Установено е, че въпреки температурните вариации при лазерната кавитетна препарация, температурните стойности не достигат начално регистрираните. Считаме, че това се дължи на подходяща техника на работа (сканираща методика, отстояние на ръкохватката от ТЗТ), прилагане на кратки лазерни импулси (SP=300 µs), както и подходящо за избраните параметри на облъчване водно-въздушно охлаждане.

Важно е да се отбележи, че при *in vitro* експериментите липсва кръвна циркулация и водното съдържание на ТЗТ е пониско, което при *in vivo* условия би осигурило разсейване на топлината и допълнително охлаждане. Очакваните температурни

промени при лазерна кавитетна препарация на витални зъби при същите параметри на облъчване биха били по-слабо изразени.

Анализът на резултатите показва, че при избор на подходящи параметри на облъчване, добро водно-въздушно охлаждане и правилна техника на работа, лазерната кавитетна препарация при дълбоки кариозни лезии не показва статистически значимо повишаване на температурата над 5.5°C и е безвредна за зъбната пулпа.

6. По задача № 6

Сравнително клинично-лабораторно изследване на антимикробната активност на ФАД, конвенционални препарати и Er:YAG лазер върху микроорганизми, изолирани от дълбоки кариозни лезии

След отстраняване на кариозната маса и obtуриране на кавитета е доказано наличие на остатъчни микроорганизми под obtурациите, които биха могли да инициират развитието на нова кариозна лезия и/или да причинят увреждане на ЗП през дентиновите каналчета, особено при тънък надпулпен дентин и дълбоки кариозни лезии. Изолирането и идентифицирането на чувствителни Грам (-) патогени може да бъде затруднено от наличието на други микробни видове, участници във възпалението, или сапрофити. Тези проблеми могат да бъдат решени чрез различни средства като селективни среди, съдържащи антибиотична добавка, която подтиска растежа на Грам (+) съвместно съжителстващи микроорганизми (коменсали). Такава среда е шоколадов агар с ванкомицин, разработен в катедра „Микробиология”, МУ – София, който е използван в нашето изследване.

I. Кавитети, третирани с ФАД

Използваният в нашето изследване препарат Fotosan съдържа активно вещество толуидиново синьо – фенотиазиново багрило с изразен антимикуробен ефект.

И в двете изследвани подгрупи изолираните бактерии са основно аеробни и факултативно анаеробни Грам (+) микроорганизми. След прилагане на ФАД е установено по-ниско микробно число и по-малко разнообразие на микробните видове, като в 82.35% от случаите бактериалната инфекция е елиминирана напълно. *Streptococcus*, *Enterobacter* и *Bacillus* са относително устойчиви на фотодинамично третиране, но след прилагане на Фотосан е установена редукция на микробното число от 100 до 1000 пъти.

Резултатите от нашето изследване потвърждават доказани от Vahabi и кол. (2011), Gonzales и кол. (2012), Yin и кол. (2013) и др. антибактериален ефект на толуидиновото синьо спрямо различни МО. Други автори установяват по-слабо изразен антимикуробен ефект на толуидиновото синьо спрямо този на метиленовото синьо. Разликите в литературните данни се дължат по всяка вероятност на разлики в използваната концентрация на багрилото, на различни светлинни източници и параметри на излъчване, на третиране на МО в суспензия или в биофилм. **Резултатите от нашето изследване подкрепят заключението на Lima и кол. (2009), че ефективното унищожаване на МО чрез ФАД може да се използва като техника за елиминирането им от дентина преди obtуриране на кавитета.**

II. Кавитети, третирани с Тубулицид

Използваният в изследването препарат Тубулицид (син) съдържа EDTA (етилендиаминтетраоцетна киселина) за отстраняване на замърсяващия слой и бензалкониев хлорид, за повишаване на антибактериалния ефект в дентина. По литературни данни разтворът не повлиява здравината на връзката с КМ, биологично поносим е и може да бъде използван като кавитетен дезинфектант.

И в двете изследвани подгрупи изолираните бактерии са основно аеробни и факултативно анаеробни Грам (+) микроорганизми. След прилагане на Тубулицид е установено пониско микробно число и по-малко разнообразие на микробните видове, като в 80% от случаите бактериалната инфекция е елиминирана напълно. *Staphylococcus aureus* е относително устойчив, но след прилагане на Тубулицид е установена 100-кратна редукция на микробното число. При пробите с изолиран *Streptococcus mitis* се наблюдава от 10 до 10 000 пъти намаляване на броя на живите микроорганизми.

Ефектът на EDTA е доказан отдавна. Установено е, че използването на 0.2% EDTA осигурява по-чиста дентинова повърхност, сравнено с други разтвори, отстранява размазания пласт, отваря дентиновите тубули, не предизвиква възпаление в ЗП. **Резултатите от нашето изследване потвърждават данните, получени от Torstenson и кол. (1995) и Sharma и кол. (2009). Те установяват много добър антибактериален ефект на Тубулицид, но не 100% унищожаване на остатъчните МО.** При изследване на антимикробния ефект на различни препарати Murat и кол. (2006) доказват, че Тубулицид има идентичен дезинфекциращ ефект с този на хлорхексидина, и е по-ефективен от кислородната вода.

III. Кавитети, препарирани с Er:YAG лазер

Er:YAG лазерът има доказан антибактериален ефект, дължащ се на специфичните му характеристики. Лазерната светлина с $\lambda = 2940$ nm се абсорбира във висока степен от водата, което спомага за унищожаване на МО чрез термично разкъсване на включените в тях водни молекули. **Едно от важните предимства на Er:YAG лазера е, че за да е ефективен, не е необходимо да бъде в плътен контакт с прицелната тъкан за разлика от химичните дезинфектанти.**

Както и в предходните изследвани групи, от кариозните лезии, третирани с лазер, е изолирана полимикробна флора. Установен е най-висок относителен дял на Грам (+) МО, което

потвърждава факта, че повечето киселинно-образуващи МО са Грам (+).

В 46.67% от случаите след кавитетна препарация с Er:YAG лазер бактериалната инфекция е елиминирана напълно. *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus* и *Corynebacterium* са относително устойчиви на действието на лазерното лъчение, но бактериалното число е не по-високо от 10 000 cfu/ml.

Hibst и кол. (1996) и Sharon-Buller и кол. (2003) установяват значителна редукция на МО при лазерна кавитетна препарация (до 90%). В научната литература съществуват и данни за недостатъчно добър антибактериален ефект на Er:YAG лазера, при който се доказва само частично намаление на броя на живите МО. **Резултатите от настоящото изследване потвърждават наличието на статистически значима редукция на МО, но тя е под 50%.**

Анализът на данните показва, че и при трите използвани в нашето изследване антибактериални способа (ФАД, Тубулицид, Er:YAG лазер) статистически значимо намалява броят на пробите с остатъчна инфекция и то със значителна редукция на микробното число ($p < 0.05$). **Най-слабо изразен е антибактериалният ефект на Er:YAG лазера (46.67% елиминиране на бактериалната инфекция), следван от Тубулицид (80%) и ФДТ (82.35%).** Тези резултати са в противоречие с данните, получени от Meire и кол. (2012), които установяват по-добър антимикуробен ефект на Er:YAG лазерът, сравнен с ФДТ.

Анализът на резултатите от трите изследвани групи (ФАД, Тубулицид и Er:YAG лазер) показва статистически значима разлика в относителния дял на кавитетите с остатъчна инфекция при групите, третирани с ФАД и Er:YAG лазер. **Ако използваме тристепенна скала за оценка на ефективността на метода за дезинфекция на кавитетите (нисък, среден, мощен ефект), може да обобщим, че ФАД и Тубулицид имат мощен, а Er:YAG лазерът – средно изразен антибактериален ефект.** Смятаме, че доказаният най-добър антимикуробен ефект на ФДТ

се дължи на мултиприцелното действие на метода, както и на образуването на синглетен кислород, който е устойчив на антиоксидантните ензими на МО. **Въз основа на получените резултати не можем да посочим кавитетната подготовка с Er:YAG лазер като оптимално ефективно средство за елиминиране на бактериалната инфекция. Препоръчваме след лазерна подготовка допълнителна медикация на кавитета преди obtуриране.**

Наличието на висок процент остатъчни МО, изолирани от кавитетите, третирани с дестилирана вода (група I.1. – 85%; група II.1 – 100%) сочи, че тя не е подходяща за окончателна обработка на кавитета преди obtуриране.

VI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Целта на настоящата разработка е да се проучи чрез експериментални и клинично-лабораторни изследвания въздействието на фотоактивираната дезинфекция и високоенергийния Er:YAG лазер при дълбоки кариозни лезии. Анализът на данните от нашите изследвания във връзка с изпълнение на поставената цел ни дава основание да направим следните констатации:

1. По задача 1. *In vitro* изследване за цитотоксичност на различни фотосенсибилизатори (Zn-съдържащи ФС, GaPc, Fotosan) върху клетъчни култури от ембрионални фибробласти от мишка

1.1. Установена е незначителна или липсваща тъмнинна цитотоксичност след прилагане на Zn-съдържащи ФС в широк диапазон концентрации.

1.2. Доказана е дозозависима цитотоксична активност на Zn-съдържащите съединения α , β и ZnPc след облъчване с лазер с $\lambda=635$ nm.

1.3. Най-ниската токсична доза, при която се установява статистически значима разлика, за ФС α и ZnPc е 1 μ M, докато за β е 4 μ M.

1.4. Цитотоксичност под 50% се установява за ФС α при концентрация под 4 μ M, за ZnPc – под 2 μ M, и за β – при всички изследвани концентрации.

1.5. Изследваният GaPc показва наличие на тъмнинна токсичност при две от приложените концентрации, както и изразен цитотоксичен ефект след облъчване с лазер с $\lambda=635$ nm при всички изследвани концентрации (от 10 до 0.125 μ M).

1.6. Препаратът Fotosan (Agent High) след *in vitro* третиране не е токсичен за съединително-тъканни елементи (ембрионални фибробласти от мишка).

1.7. Цитотоксичност под 50% е установена след прилагането на ФС GaPc и Fotosan (Agent High) при всички изследвани концентрации след облъчване със специфичен източник на светлина.

1.8. Фотосенсибилизатор Fotosan (Agent High) показва най-ниска токсичност в сравнение с всички тествани съединения.

1.9. Най-висока светлинна цитотоксичност показва фотосенсибилизатор GaPc (0.125 μ M).

2. По задача 2. *In vitro* изследване за фототоксичност на лазерно лъчение с различни дължини на вълната (Er:YAG, Nd:YAG и диоден лазер) върху клетъчни култури от ембрионални фибробласти от мишка

2.1. Облъчването с лазер с дължина на вълната 665, 1064 и 2940 nm през дентинни шлифове с дебелина от 1 mm не предизвиква статистически значим цитотоксичен ефект върху клетъчни култури от ембрионални фибробласти от мишка при използваните параметри. Следователно трите лазера са подходящи за клинично приложение при остатъчен надпулпен дентин с дебелина 1 mm.

2.2. Установено е нарастване на фототоксичния ефект при удължаване на експозицията.

3. По задача 3. *In vivo* изследване на биологичната поносимост (цитотоксичност и фототоксичност) на ФС и лазерно лъчение върху опитни животни

3.1. Установена е липса на фототоксичност спрямо подкожната съединителна тъкан на опитни животни при прилагане на лазерно лъчение с дължина на вълната 665 nm при използваните параметри.

3.2. Прилагането на GaPc предизвиква по-силно изразена тъканна реакция, сравнено с ZnPc, което съответства на резултатите от изследване на цитотоксичност на клетъчни култури по задача 1.

3.3. Прилагането на ZnPc и GaPc *in vivo* предизвиква по-слабо изразени промени спрямо тези, доказани при изследване на клетъчни култури по задача 1.

3.4. Макроскопското и хистоморфологично сравнително изследване на ZnPc и GaPc показва добра биологична поносимост на подкожната съединителна тъкан на опитни животни при изследваните концентрации. Фталоцианиновите ФС не предизвикват остра тъканна реакция, както и прояви на алергична реакция. Описаните хистологични изменения представляват по същество иритативни промени.

3.5. Най- силно изразени промени в тъканите са установени при използване на Fotosan. Те се дължат вероятно на високия му вискозитет (съдържа глицерин и ксантен), както и на по-големия лумен на иглите, използвани за субкутанното му инжектиране.

4. По задача 4. Изследване на антимикробната активност на ФАД върху референтни бактериални щамове (*S. mutans*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *C. albicans*)

4.1. Трите използвани ФС (ZnPc, GaPc, Fotosan) показват антибактериален ефект спрямо изследваните МО, изразен в различна по степен редукция на микробното число.

4.2. Най-бърз и значим антимикробен ефект спрямо изследваните МО е установен при прилагането на Fotosan (Agent High) (1 min.). Изключение правят пробите с *C. albicans*, където най-добър антибактериален ефект показва ZnPc.

4.3. Металфталоцианиновите ФС (ZnPc и GaPc) показват най-добър антибактериален ефект на 12 и 20 min от облъчването (за *S. mutans* – 5 min).

4.4. Установен е леко изразен превес в антимикробната активност на GaPc спрямо ZnPc срещу изследваните МО, с изключение на *C. albicans*.

4.5. При фотосенсибилизаторите ZnPc и Fotosan е доказана липса на тъмнинна токсичност, докато при GaPc е установена нежелана тъмнинна токсичност в пробите със *S. mutans*.

4.6. Използваният лазерен източник (диоден лазер) не показва светлинна токсичност.

4.7. Най-податливи на ФАД са МО от групата на *S. mutans*, следвани от MRSA и *E. Faecalis*, а най-устойчиви са *C.albicans*.

5. По задача 5. In vitro изследване на температурните промени при кавитетна препарация с високоенергиен Er:YAG лазер

5.1. При кавитетна препарация с Er:YAG лазер и посочените параметри не се установява статистически значимо повишаване на температурата над 5.5°C.

5.2. Остатъчна дебелина на надпулпния дентин 1–1.5 mm осигурява адекватна термична защита на зъбната пулпа при използваните параметри на лазерно облъчване.

5.3. При правилна техника на работа, добро водно-въздушно охлаждане и избор на подходящи параметри на облъчване лазерната кавитетна препарация при дълбоки кариозни лезии е безвредна за зъбната пулпа.

6. По задача 6. Сравнително клинично-лабораторно изследване на антимикуробната активност на ФАД, конвенционални препарати и Er:YAG лазер върху микроорганизми, изолирани от дълбоки кариозни лезии

6.1. Изолираната от дълбоки, акутни кариозни лезии флора е полимикробна, с преобладаване на Грам (+), аеробни или факултативно анаеробни МО.

6.2. Използването на дестилирана вода за окончателна обработка на кавитета преди obtуриране (особено при дълбоки кариозни лезии) не е подходящо поради наличие на висок процент остатъчни МО (85–100%).

6.3. Най-силно изразен е антибактериалният ефект на ФАД (82.35% елиминиране на бактериалната инфекция), следван от Тубулицид (80%). Най-слабо изразено действие показва Er:YAG лазерът (46.67% редукция на МО), като разликата в антимикуробния ефект между него и ФАД е статистически значима.

VII. ИЗВОДИ

Анализът на получените резултати дава основание да се направят следните изводи:

1. Изследването за цитотоксичност върху клетъчни култури от ембрионални фибробласти от мишка установи липса на тъмнинна токсичност за Zn-съдържащи ФС и Fotosan (Agent High) и наличие на такава при GaPc. След облъчване с лазер с $\lambda=635$ nm най-ниска токсичност прояви Fotosan (Agent High), най-висока – GaPc, а при Zn-съдържащи ФС бе доказан дозозависим цитотоксичен ефект.

2. Не е установен фототоксичен ефект върху клетъчни култури от ембрионални фибробласти от мишка при облъчване с диоден, Nd:YAG и Er:YAG лазер ($\lambda =665$ nm, 1064 nm и 2940 nm) през дентинови шлифове с дебелина 1 mm при използваните параметри. Лазерното лъчение с дължина на вълната 665 nm не предизвиква фототоксичен ефект и в подкожната съединителна тъкан на опитни животни.

3. Установени са добра биологична поносимост на подкожната съединителна тъкан и липса на остра тъканна и алергична реакции при макроскопското и хистоморфологичното изследване на тъкани на опитни животни, третирани с ZnPc и GaPc при изследваните концентрации. Най-силно изразени са промените при прилагане на търговския препарат Fotosan, което вероятно се дължи на високия му вискозитет и на по-големия лумен на иглите за субкутанното му инжектиране.

4. Кавитетна препадения с Er:YAG лазер при посочените параметри (1.2 W; 120 mJ; 10 Hz; SP), подходящ водно-въздушен спрей и остатъчна дебелина на надпулпния дентин 1–1.5 mm не води до статистически значимо повишаване на температурата над 5.5°C и е безвредна за ЗП.

5. Антимикробната активност на ФАД зависи от химичната структура и концентрацията на използвания ФС, от

характеристиките на използвания светлинен източник, както и от особеностите на микробните клетки. Най-податливи на ФАД са МО от групата на *S. mutans*, следвани от MRSA и *E. Faecalis*, а най-устойчиви са МО от групата на *C. albicans*. Най-бърз и значим антимикуробен ефект е установен при прилагане на FOTOSAN, с изключение на пробите с *C. albicans*, които се повлияват най-добре от ZnPs.

6. Изолираната от дълбоки, акутни кариозни лезии флора е полимикробна, с преобладаване на Грам (+), аеробни или факултативно анаеробни МО.

7. Най-силно изразен е антибактериалният ефект на ФАД (82.35% елиминиране на МО), следван от Тубулицид (80%), а най-слабо изразено антимикуробно действие има Er:YAG лазерът (46.67%) – разликата с ФАД е статистически значима. Препоръчваме след лазерна подготовка допълнителна медикация на кавитета преди obtуриране.

VIII. ПРИНОСИ

Приноси с оригинален характер

1. За първи път е изследвана цитотоксичност на синтезирани от екип на БАН нови металфталоцианинови ФС (Zn-съдържащи ФС и GaPs) върху клетъчни култури от ембрионални фибробласти от мишка.

2. За първи път в България е изследвана цитотоксичност на Fotosan (Agent High) върху клетъчни култури от ембрионални фибробласти от мишка.

3. Установена е липсата на фототоксичност при облъчване с лазер с дължина на вълната 665, 1064 и 2940 nm през дентинови шлифове с дебелина 1 mm при използваните параметри.

4. Проведено е сравнително хистоморфологично изследване на биологична поносимост на подкожната съединителна тъкан на опитни животни спрямо новосинтезирани металфталоцианинови ФС (ZnPs и GaPs) и търговския препарат Fotosan (Agent High).

5. Проведено е сравнително изследване на антимикробния ефект на новосинтезирани металфталоцианинови ФС (ZnPs и GaPs) и Fotosan (Agent High) спрямо четири референтни бактериални щама.

6. За първи път в България е извършено регистриране на температурните промени при кавитетна препарация с Er:YAG лазер с инфрачервена камера.

7. За първи път е проведено сравнително изследване на антимикробната активност на ФАД с Фотосан, Тубулицид и Er:YAG лазер. Установено е, че ФАД и Тубулицид имат мощен, а Er:YAG лазерът – средно изразен антибактериален ефект.

Приноси с потвърдителен характер

1. Установено е, че най-податливи на ФАД са МО от групата на *S. mutans*, следвани от MRSA и *E. Faecalis*, а най-устойчиви са *C. albicans*.

2. Доказано е, че при антигъбичната ФДТ са необходими по-високи концентрации на ФС и по-мощна светлинна доза.

3. Установено е, че антимикробната активност на ФАД зависи от химичната структура и концентрацията на използвания ФС, от характеристиките на използвания светлинен източник, както и от особеностите на микробните клетки.

4. Потвърдено е, че кавитетната подготовка с Ег:YAG лазер не води до статистически значимо повишаване на температурата над 5.5°C. При правилна техника на работа и подходящи параметри спрямо клиничната находка кавитетната подготовка с високоенергиен лазер е безвредна за ЗП.

5. Потвърдено е, че изолираната от дълбоки, акутни кариозни лезии флора е полимикробна, с преобладаване на Грам (+), аеробни или факултативно анаеробни МО.

6. Установен е статистически значим антибактериален ефект при прилагане на ФАД с Fotosan, Тубулицид и Ег:YAG лазер.

IX. ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

ПУБЛИКАЦИИ

1. **Доганджийска, В.**, Сл. Димитров. Кавитетна подготовка с лазери. Проблеми на стоматологията 2005, XXXI, 11–20.

2. Gueorgieva, Tz., Sl. Dimitrov, **V. Dogandzhiyska**, V. Kalchinov, M. Belcheva, V. Mantareva, I. Angelov, V. Kussovski. Susceptibility of *Staphylococcus aureus* to methylene blue, haematoporphyrin, phthalocyanines photodynamic effects. J. of IMAB, 2010, 16 (4): 51–53.

3. **Dogandzhiyska, V.**, R. Gergova, Sl. Dimitrov, M. Doychinova. Antimicrobial activity of photodynamic therapy against microorganisms isolated from deep carious lesions. Journal of IMAB 2013, 19 (4): 430–434.

УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ

Постери

1. Dimitrov, Sl., Tz. Gueorgieva, **V. Dogandzhiyska**, M. Belcheva, V. Mantareva, I. Angelov, V. Kussovski. Photodynamic Inactivation of *Enterococcus faecalis* with porphyrin and phthalocyanines. 19th Annual Assembly of IMAB, 7–10.05.2009, Varna, Bulgaria.

2. **Dogandzhiyska, V.**, A. Kril, Sl. Dimitrov. Investigation of phototoxicity of laser irradiation. 17th International School on Quantum Electronics „Laser Physics and Applications” (ISQE), 24–28 September, 2012, Nessebar, Bulgaria.

3. **Dogandzhiyska, V.**, M. Dencheva, A. Kisselova, Sl. Dimitrov. Temperature changes by cavity preparation with Er:YAG laser. 19th Congress of BASS, 2014, 24–27 April, Belgrade, Serbia.

4. **Dogandzhiyska, V.**, Sl. Dimitrov, Ts. Uzunov. Antimicrobial activity of photodynamic therapy and Fotosan. 20th Congress of BASS, 23–26 April, 2015, Bucharest, Romania.

Изказвам благодарност на моите научни ръководители *проф. д-р Славчо Димитров и проф. д-р Цонко Узунов* за насоките и подкрепата.

Благодаря за професионалната помощ и съвети на:

Доц. Иван Ангелов, ИОХЦФ – БАН

Доц. Ваня Мантарева, ИОХЦФ – БАН

Доц. Веселин Късовски, ИМ – БАН

Доц. Антон Крил, ИЕМПАМ – БАН

Доц. Райна Гергова, катедра „Медицинска микробиология“, МУ – София

Доц. Илияна Стоева-Иванова, катедра „Образна диагностика, дентална алергология и физиотерапия“, ФДМ, МУ – Пловдив

Доц. Мария Денчева-Гарова, катедра „Образна и орална диагностика“, ФДМ, МУ – София

Д-р Николай Шумков, НЦОЗА

Зоонж. Йонко Семерджиев, отговорник за ХОЖ на Виварума на МФ при МУ – София

Благодаря на *колегите от катедра „Консервативно зъболечение“* за подкрепата. Специална благодарност на *д-р Емилия Карова* за съдействието.

Искрено благодаря на *моего семейство* за обичта и търпението.