

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)**

**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

София, 2016 г.

# СЪДЪРЖАНИЕ

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ.....	4
<b>I. ВЪВЕДЕНИЕ .....</b>	<b>5</b>
<b>II. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР .....</b>	<b>8</b>
<b>1. ЦЕЛ НА БИОЛОГИЧНИТЕ МЕТОДИ НА ЛЕЧЕНИЕ .....</b>	<b>8</b>
<b>2. ОСНОВАНИЯ ЗА ПРИЛОЖЕНИЕ НА БИОЛОГИЧНИТЕ МЕТОДИ НА ЛЕЧЕНИЕ .....</b>	<b>8</b>
<b>3. ПРИЧИНИ ЗА ВЪЗПАЛЕНИЕ НА ЗЪБНАТА ПУЛПА И ПАТОХИСТОЛОГИЧНИ ПРОМЕНИ ПРИ ДЪЛБОК ЗЪБЕН КАРИЕС .....</b>	<b>10</b>
<b>4. ИНДИРЕКТНО ПУЛПНО ПОКРИТИЕ .....</b>	<b>11</b>
4.1. Индикации.....	11
4.2. Контраиндикации.....	11
4.3. Цел.....	11
4.4. Изисквания към методиката .....	12
4.5. Съвременни подходи при лечение на зъбен кариеc – минимално инвазивна препарация.....	13
4.6. Фактори, компрометиращи оздравителния процес. Значение на микроорганизмите и характеристиките на дентина.....	15
4.7. Материали, медикаменти и допълнителни средства, прилагани при биологичните методи на лечение и влиянието им върху оздравителния процес.....	18
<b>5. ЛАЗЕРНО ЛЪЧЕНИЕ И ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРИ – СРЕДСТВА, ПОДПОМАГАЩИ ОЗДРАВИТЕЛНИТЕ ПРОЦЕСИ ПРИ ИНДИРЕКТНО ПУЛПНО ПОКРИТИЕ .....</b>	<b>21</b>
5.1. Лазери .....	21
5.2. Фотоактивирана дезинфекция .....	33
<b>6. АНАЛИЗ НА ЛИТЕРАТУРНИЯ ОБЗОР .....</b>	<b>46</b>
<b>III. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ .....</b>	<b>51</b>
<b>СОБСТВЕНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ .....</b>	<b>52</b>
<b>IV. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ .....</b>	<b>52</b>
<b>1. МАТЕРИАЛ .....</b>	<b>52</b>
<b>2. МЕТОДИ .....</b>	<b>60</b>
2.1. <i>In vitro</i> изследване за цитотоксичност на различни фотосенсибилизатори (Zn- съдържащи ФС, GaPs, Fotosan) върху клетъчни култури от ембрионални фибробласти от мишка.....	60
2.2. <i>In vitro</i> 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.....	62
2.3. <i>In vivo</i> изследване на биологичната поносимост (цитотоксичност и фототоксичност) на ФС и лазерно лъчение върху опитни животни.....	64
2.4. Изследване на антимикробната активност на ФАД върху референтни бактериални щамове ( <i>S. mutans</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>C. albicans</i> ).....	68
2.5. <i>In vitro</i> изследване на температурните промени при кавитетна препарация с високоенергиен Er:YAG лазер.....	70
2.6. Сравнително клинично-лабораторно изследване на антимикробната активност на ФАД, конвенционални препарати и Er:YAG лазер върху микроорганизми, изолирани от дълбоки кариозни лезии.....	72
2.7. Статистически методи.....	75

<b>V. РЕЗУЛТАТИ .....</b>	<b>77</b>
1. По задача № 1 .....	77
2. По задача № 2 .....	80
3. По задача № 3 .....	81
4. По задача № 4 .....	94
5. По задача № 5 .....	102
6. По задача № 6 .....	105
<b>VI. ОБСЪЖДАНЕ .....</b>	<b>111</b>
1. По задача № 1 .....	111
2. По задача № 2 .....	113
3. По задача № 3 .....	114
4. По задача № 4 .....	117
5. По задача № 5 .....	126
6. По задача № 6 .....	130
<b>VII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....</b>	<b>137</b>
<b>VIII. ИЗВОДИ .....</b>	<b>142</b>
<b>IX. БИБЛИОГРАФИЯ .....</b>	<b>144</b>
<b>X. ПРИЛОЖЕНИЯ .....</b>	<b>176</b>

## ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

АТФ	Аденозинтрифосфат
ВЛ	Вестибуло-лингвален
ГЙЦ	Глас- йономерен цимент
ДНК	Дезоксирибонуклеинова киселина
ЕДГ	Емайло-дентинова граница
ЕОД	Електроодонтодиагностика
ЗП	Зъбна пулпа
КА	Кръвен агар
КМ	Композиционен материал
МД	Медио-дистален
МА	Мак Конки агар
МО	Микроорганизми
РНК	Рибонуклеинова киселина
С	Сабуро агар
США	Селективна среда шоколадов агар с ванкомицин
Т	Бульон на Тароци
ТЗТ	Твърди зъбни тъкани
УВЧ	Ултрависокочестотни токове
ФАД	Фотоактивирана дезинфекция
ФДТ	Фотодинамична терапия
ФС	Фотосенсибилизатор
ША	Шоколадов агар
ART	Атравматично възстановително лечение
CGRP	Калцитонин генно свързан пептид
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium (Модифицирана Игъл хранителна среда на Дюлбеко)
DMF	Диметилформаид
DMSO	Диметилсулфоксид
EDTA	Етилендиаминтетраоцетна киселина
GalPc	Галий-съдържащ фотосенсибилизатор
IgA	Имуноглобулин А
IgG	Имуноглобулин G
HE	Хематоксилин-еозин
HEMA	Хидрокси етил метакрилат
KHN	Твърдост по Кноп (Кноор)
LED	Светлинно излъчващ диод
MB	Метиленово синьо
MRSA	Метицилин резистентен <i>Staphylococcus aureus</i>
MSP	Средно къс лазерен импулс
MTA	Минерал триоксид агрегат
PBS	Буфериран физиологичен разтвор
SDS	Натриев додецилсулфат
SP	Къс лазерен импулс
TBO	Толуидиново синьо
TEGDMA	Триетилен гликол диметакрилат
THF	Тетрахидрофуран
ZnPc	Цинк-съдържащ фотосенсибилизатор
$\alpha$ Gal-ZnPc	$\alpha$ -галактоза заместен цинк-съдържащ фотосенсибилизатор
$\beta$ Gal-ZnPc	$\beta$ -галактоза заместен цинк-съдържащ фотосенсибилизатор

## **I. ВЪВЕДЕНИЕ**

Зъбният кариес е едно от най-често срещаните хронични заболявания в света. Представлява мултифакторно обусловено заболяване с водещ етиологичен фактор микроорганизмите (МО), които метаболизират хранителни въглехидрати и образуват киселини.

Кариозните лезии се състоят от два слоя:

– Външен слой – инфектиран дентин (размекнат дентин; с голям брой МО).

– Вътрешен слой – афектиран дентин (засегнат дентин; открива се ограничено количество МО; подлежи на реминерализация).

Клиничното отдиференциране на двата слоя понякога е трудно и често в практиката те биват отстранявани заедно. Премахването на афектирания дентин, който би могъл да бъде реминерализиран, създава риск от разкриване на зъбната пулпа (ЗП) при третиране на дълбоки кариозни лезии, предпоставка е за инвазия на МО и може да доведе до нейното увреждане.

Запазването на виталитета и функцията на зъбната пулпа е важен проблем в консервативното зъболечение, особено при зъби с незавършено кореново развитие. При напредване на кариозната лезия количеството на възпалителните фактори в пулпата се повишава, а при достигане на 0.5 mm остатъчна дебелина на надпулпния дентин се установява остра възпалителна реакция.

Съществуващите класически лечебни методи с отстраняване на възпалената зъбна пулпа не задоволяват изискванията на съвременната консервативна терапия и противоречат на принципите на щадящото лечение. Третирането на възпалената пулпа трябва да бъде насочено към прекратяване на възпалителния процес, към намаляване на болката, стимулиране на трофиката и регенерацията на тъканите. Методите на щадящо биологично лечение са индицирани и могат да

бъдат приложени само в началния, обратим стадий на възпаление. Оздравителен процес в ЗП може да настъпи само когато тя е възпалена, но не е инфектирана.

След конвенционална екскавация и obtуриране на кавитета е доказано наличие на остатъчни микроорганизми под obtурациите. Те могат да бъдат локализирани в дентиновите каналчета, по кавитетните стени и в неотстранения замърсяващ слой, получен при механичното инструментирание. Част от запечатаните микроорганизми не оцеляват, но други продължават своето развитие. Доказано е наличие на живи МО повече от година след obtуриране на кавитети. Виталните бактерии биха могли да инициират развитието на нова кариозна лезия и/или да причинят увреждане на ЗП през дентиновите каналчета, особено при тънък надпулпен дентин при дълбоки кариозни лезии. Два са основните механизма на увреждане на ЗП – директен и индиректен (чрез ензими, токсини, ендотоксини, бактериални метаболити).

Съвременните тенденции при третиране на кариозните лезии целят максимално консервативна кавитетна препарация с минимално отстраняване на твърди зъбни тъкани (ТЗТ) и запазване на потенциално репарабилен, афектиран дентин, който може да бъде реминерализиран. Максималната редукция на МО, наред с качествена obtурация, са от първостепенно значение за успешния изход на лечението при дълбоки кариозни лезии, за запазване на виталитета на ЗП и за подобряване на дългосрочната прогноза на зъба. С цел отстраняване на остатъчните МО се използват различни антимикробни препарати. Част от тях (някои вече с историческо значение, като еugenol) оказват дразнещо действие и могат да увредят и без това засегнатата ЗП. Други водят до намаляване здравината на адхезивната връзка с композиционния материал (КМ), което също би компрометирало оздравителния процес. Някои от използваните препарати не притежават достатъчно силен антибактериален ефект и не отстраняват напълно замърсяващия слой. В

търсене на максимално ефективен, но с минимален увреждащ ефект антибактериален метод, в последните години се разработват различни методики – озонтерапия, препарация с високоенергийни лазери, фотоактивирана дезинфекция (ФАД) и др.

Приложението на лазерното лъчение в денталната практика придобива все по-широка популярност. Различни лазерни техники подобряват прогнозата при биологичните методи на лечение. 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 (напр. бактерии в дентинови каналчета, истмуси, странични канали). Доказано е, че 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 препарация. Целта е селективно отстраняване на кариозния дентин, максимално запазване на здрави ТЗТ, бактерициден ефект. Нискоенергийните лазерни системи притежават директен биостимулиращ ефект върху ЗП. Едно от съвременните направления е тяхното приложение при фотоактивираната дезинфекция. 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 актуалност на проблема и необходимост от допълнителни изследвания.

## **II. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР**

### **1. Цел на биологичните методи на лечение**

Основната цел на биологичните методи на лечение е запазването на виталитета и функцията на зъбната пулпа чрез аплициране на защитен агент върху тънък слой надпулпен дентин или върху открита зъбна пулпа [1, 17, 22, 43, 53].

Отстраняването на етиологичния фактор и подобряването на защитните, градивни и трофични функции на ЗП, а оттам и успехът на лечението зависят както от избора на медикаментозно средство, неговото правилно дозиране и приложение, така също и от запазените регенеративни възможности на пулпата и от стадия на възпалителния процес. По литературни данни успехът на биологичното лечение варира в широки граници – между 44–95%. Влияние оказват големината на комуникацията, локализацията, възрастта на пациента и херметичното запечатване на зъбната пулпа спрямо бактериалната пенетрация [1, 3, 30, 40, 45]. Значение има и дебелината на остатъчния дентин – колкото по-голяма е тя, толкова по-слабо е възпалението [52].

Физикалните средства и методи, които имат противовъзпалителен, обезболяващ и стимулиращ трофиката и регенерацията ефекти, подпомагат рутинните методи на лечение и ускоряват оздравителните процеси [2, 22, 26, 35]. Особено голямо е значението на лазерните лъчения, които в последно време намират приложение в почти всички области на медицината [36, 46, 47]. Някои от приложенията им нямат алтернатива.

### **2. Основания за приложение на биологичните методи на лечение**

Зъбната пулпа, както другите видове съединителна тъкан, също има потенциал да оздравява. Регенеративните ѝ възможности се

изразяват в реорганизация на увредената мека тъкан, в диференциация на субодонтобластни в одонтобластоподобни клетки и в репарирание на експонираната тъкан, чрез образуване на репаративен дентин [3, 52]. Стволови клетки се откриват в определени области във всяка тъкан, където могат да съществуват статично (в състояние на покой), докато бъдат активирани от заболяване или от увреждане на тъканта. Пролиферация, миграция и диференциация на пулпните стволови клетки не се наблюдава, когато пулпата не е открита или докато няма значителна загуба на одонтобласти, свързана със загуба на голямо количество дентин [159, 186]. Възможно е дентиновата генеза да бъде вторично индуцирана чрез пулпна репарация. Диференциацията на пулпни клетки в издължени, поляризирани, формиращи предентин клетки, може да се осъществи чрез:

1. Дедиференциране на мезенхимни клетки от дълбоките участъци на зъбната пулпа в недиференцирани мезенхимни клетки, които се диференцират в одонтобласти.

2. Директно индуциране и диференциация на съществуващи недиференцирани мезенхимни клетки [159, 186].

Диференциацията на одонтобластоподобни клетки в зоната на оздравяване на зъбната пулпа зависи от стимулацията на компетентни субодонтобластни клетки от биоактивни молекули в дентиновия матрикс, като например трансформиране на изоформи на растежен фактор  $\beta 1$  в комбинация с екстрацелуларни матриксни компоненти, напр. фибронектин. Доказано е, че различни биоактивни молекули, намиращи се в дентиновия матрикс, могат също да индуцират образуването на дентинов мост и намаляване обема на пулпната камера [135, 136].

### **3. Причини за възпаление на зъбната пулпа и патохистологични промени при дълбок зъбен кариес**

Факторите, които могат да причинят възпаление на ЗП, са многообразни – инфекциозни, механични, термични, осмотични, химиотоксични и др. [24, 33, 34, 41, 45]. Доказано е, че в 95% от случаите възпалението на пулпата е резултат от прогресиране на зъбен кариес, което го превръща в основна причина за нейното увреждане [49].

Когато кариесът достигне до дентина, бактериалните токсини, киселини и антигени дифундират през дентиновите каналчета към одонтобластните израстъци [199]. Насоченото навън движение на течността в дентиновите каналчета не пречи на дифузията, особено при дълбоки кариозни лезии, където те са по-широки и многобройни. В резултат на дразненето настъпват изменения в одонтобластния слой на пулпата – разместване на одонтобластните клетки, намаляване на броя им (може да се редуцират до 1 ред), вакуолизация, аспириране на техните ядра [3, 6, 26, 45]. Хистологично се установява липса или много тънък пласт предентин, пулподентиновата мембрана не се вижда [49].

Зъбната пулпа отговаря на дразненията с възпалителна реакция [4, 49, 52, 200]. Активират се кинини, коагулини, системата на комплемента, също и ензимно-асистирана трансформация на арахидоновата киселина в група биологичноактивни медиатори (простагландини, тромбоксани, левкотриени, хидропероксиетикозанова киселина, хидроксиетикозанова киселина). Хистологично в субодонтобластните тъкани се установява наличие на многобройни разширени и препълнени съдове, а около тях клетъчен инфилтрат от фибробласти, макрофаги и хронични възпалителни клетки. Многоядрените неутрофили, плазмоцитите и лимфоцитите са

разположени под инфектираните дентинови каналчета и около кръвоносните съдове. В пулпата не се наблюдават бактерии [3, 4, 14, 49], въпреки че някои автори съобщават за наличие на единични МО [155].

При зъбен кариес описаните промени в пулпата са преходни и след отстраняване на основните причини и лечение на кариеса търпят обратно развитие [49].

#### **4. Индиректно пулно покритие**

Методът се състои в отстраняване на кариозна маса от дълбока кариозна лезия, чрез запазване на тънък слой дентин, който покрива ЗП. Този слой може да бъде преоцветен или в някои случаи по-мек деминерализиран дентин.

##### **4.1. Индикации**

а) Дълбоки и много дълбоки кариозни лезии, разположени в непосредствена близост до ЗП (*Caries profunda*, *Caries profundissima*).

б) Хиперемия на зъбната пулпа.

в) Реверзиблени пулпити.

г) Неусложнена фрактура на зъбната корона.

##### **4.2. Контраиндикации**

а) Необратими пулпити.

б) Наличие на комуникация със ЗП (в резултат на прогресиране на кариозен процес, механично, ятрогенно разкритие на ЗП).

в) Наличие на некротична пулпа.

##### **4.3. Цел**

Стимулиране на образуването на секундерен и третичен (защитен) дентин и запазване на виталитета на ЗП [1, 3]. Изразява се в отстраняване на дразнителите, причиняващи възпаление на ЗП, което

позволява възстановяване на циркулацията, клетъчния метаболизъм и функция:

- а) отстраняване на кариозната маса;
- б) унищожаване на микроорганизмите, причиняващи развитието на кариес;
- в) неутрализиране на киселинността в дентина;
- г) поставяне на медикаменти, които стимулират одонтобластната активност.

Лечението на дълбокия зъбен кариес и обратимите заболявания на зъбната пулпа чрез щадящия индиректен метод се основава на възможността за дрениране на възпалителния ексудат през дентиновите каналчета, от една страна, и проникване на медикаментозни средства, от друга. Целесъобразно е прилагането на средства с обезболяващ, антибактериален, противовъзпалителен и стимулиращ пластичните и регенеративни функции на зъбната пулпа ефекти [3, 45]. Основната методика за приложение е апликацията на медикамента в зъбния кавитет. Прилага се също така и електрофоретично въвеждане на обезболяващи и противовъзпалителни средства към зъбната пулпа [2].

#### **4.4. Изисквания към методиката**

- а) Предварително почистване на зъба от налепи и плака, полиране, дезинфекция.
- б) Добра изолация на кавитета от слюнката.
- в) Витална зъбна пулпа.
- г) Липса на кариозна маса по емайло-дентиновата граница на кавитета. При дълбоки кариозни лезии е допустимо оставяне по пулпната и/или аксиалната стена на деминерализиран или кариозен дентин, който впоследствие се ревизира.
- д) Възможност зъбът да бъде оптимално дефинитивно възстановен.

е) Регулярно проследяване на състоянието на ЗП и виталитета на зъба (1 седмица, 1, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 36 месеца). Методи – електроодонтодиагностика (ЕОД), пулсова оксиметрия. Липсата на данни за увреждане на ЗП при ЕОД не изключва патологични промени в нея. Отслабен или хиперсензитивен отговор ще даде ранни индикации за необходимост от бъдещо лечение.

ж) Регулярно рентгенографско изследване. Периапикалната рентгенография, направена след дефинитивната obturation, се запазва и сравнява със следващи контролни рентгенографии (след 6, 12, 18, 24 месеца).

#### **4.5. Съвременни подходи при лечение на зъбен кариес – минимално инвазивна препарация**

Съвременното съхраняващо тъканите лечение, като ултраконсервативното отстраняване на кариеса, атравматичните възстановителни техники и процедури за индиректно пулпно покритие доказват, че прогресирането на кариозния процес може да бъде спряно, а засегнатата тъкан – реминерализирана [39, 45, 77, 78, 116, 122, 156, 192, 208, 245, 327].

В началото на 1990 г. Международната дентална федерация предлага нова стратегия, наречена атравматично възстановително лечение (ART), състоящо се в отстраняване на кариозните тъкани само с ръчни инструменти и без анестезия. Кариозният дентин се отстранява частично – до момента на усещане на болка от страна на пациента или при риск от разкриване на ЗП. След почистване на кавитета зъбът се запечатва с глас-йономерен цимент (ГЙЦ). Установено е, че за период от 3 години, процентът на напълно клинично здравите obturation е 85,3% [122].

Минимално инвазивната техника при отстраняване на зъбния кариес запазва потенциално репарабилен засегнат от кариес дентин,

който може да бъде реминерализиран [39]. Пълното отстраняване на кариозния дентин от дълбоки кариозни лезии в някои случаи може да доведе до механична експозиция на ЗП и инвазия на микроорганизми. В тези случаи, с цел да се избегне увреждането на пулпната тъкан, е индицирано отстраняване на кариозната маса на етапи или индиректно пулпно покритие [49, 295]. Клиничните процедури включват частично отстраняване на кариозния дентин и оставяне на тънък слой засегнат дентин над ЗП, така че тя да не бъде механично открита. Зъбът се затваря провизорно за 45 дни, като за този период се очаква образуване на репаративен или склеротичен дентин. Ако след този период виталитетът на зъба е запазен, кариозният дентин се отстранява напълно и зъбът се възстановява дефинитивно. Целта на цялостното отстраняване на зъбния кариес е осигуряване на дълготрайност на възстановителния резултат, чрез елиминиране на микроорганизмите. Непълното отстраняване на кариозния дентин и запечатването на зъба за определен период от време води до редуциране на количеството на микроорганизмите, до клинични промени в цвета и консистенцията на остатъчния дентин, до повишаване на рентгенографската плътност [193]. Смята се, че оцветяването на спрели развитието си кариозни лезии се дължи на дегенеративни изменения в микроорганизмите, в остатъчния кариозен дентин, след като той е бил запечатан. След ревизия се установява наличие на по-сух остатъчен кариозен дентин и по-малко количество микроорганизми. Смята се, че когато бактериите са изолирани от оралната среда, те умират или се инактивират и няма признаци за прогресиране на кариозната лезия [52, 77, 78, 193].

Не съществуват напълно сигурни клинични параметри, които да определят цялостното отстраняване на кариозния дентин, независимо дали става въпрос за твърдост при сондиране или оцветяване с багрила (кариес-детектори). Изследванията са показали, че критериите за

твърдост на остатъчния дентин, широко използвани като индикация за отстранена кариозна маса, невинаги гарантират липсата на микроорганизми [241]. Зависимостта между твърдостта на дентина след отстраняване на кариозна маса и количеството остатъчни бактерии не е ясна. Микротвърдостта на кариозния дентин е в границите на 14 до 38 KHN, докато при здравия дентин очакваните стойности са между 53 до 80 KHN [99, 241]. Микротвърдостта е пряко свързана с минералното съдържимо [58].

Знае се, че след конвенционална екскавация съществуват остатъчни микроорганизми, като наличието на бактерии под obturациите е добре документирано [81, 260]. Резултатите от редица изследвания подкрепят идеята, че ефективността на поетапната екскавация с повторно отваряне на кавитета и цялостно отстраняване на кариозния дентин трябва да бъде преразгледана, имайки предвид, че броят на живите микроорганизми е бил редуциран и липсват клинични и радиографски признаци за прогресия на кариеса след запечатване на зъба, което е свидетелство за защитния капацитет на пулподентинния орган [147]. Допълнителни недостатъци на поетапната екскавация са възможността за достигане до ЗП при повторното отваряне на зъба и нейното инфектиране, забавянето на оздравителния процес, както и увеличаването на броя на клиничните посещения [295].

#### **4.6. Фактори, компрометиращи оздравителния процес. Значение на микроорганизмите и характеристиките на дентина**

Като фактори, компрометиращи оздравителния процес на зъбната пулпа при стриктно спазени индикации и протокол на работа, се посочват: просмукване на микроорганизми през пространството obturация–зъб, цитотоксичност на obturационните материали, чувствителност на оперативните техники, по-възрастни пациенти [45, 120]. Значение имат също правилната диагноза, точното определяне на

тежестта на травмата, контролът върху кървенето и ексудацията, контролът на инфекцията – недопускането на бактериална контаминация от слюнката [96]. Смята се обаче, че най-важният фактор за успех на биологичното лечение е липсата на микроорганизми. Установено е, че възстановителни материали, които се смятат за токсични, не водят до пулно възпаление и/или некроза, когато се поставят директно върху открита зъбна пулпа, ако бактериалната инфекция е елиминирана [97].

Механичното инструментирание на кавитета води до покриването му със замърсяващ слой, който затваря отворите на дентиновите каналчета. Възможно е в тях да бъдат запечатани микроорганизми, ендотоксини и други бактериални продукти и това да компрометира оздравителния процес и регенерацията на пулпната рана [3, 184].

Най-често срещаните микроорганизми при зъбен кариес са *Streptococcus mutans*, лактобацилите и актиномицетите [4]. Лактобацилите се свързват с прогресирането на кариозния процес. Техните ацидогенни и ацидурични характеристики обясняват преобладаването им в дълбоки кариозни лезии, когато рН е силно киселинно. *S. mutans* също е киселинно-продуциращ микроорганизъм, който може да измести метаболитната активност към по-ниски рН-стойности. Тази група микроорганизми играе важна роля при кариес на дентина. Смята се, че в ранните стадии на прогресиране на кариеса през дентина преобладават кариогенни микроорганизми като *Streptococcus mutans* и лактобацили [4, 259]. Тези микроорганизми са отделени от ЗП чрез линия здрав дентин, имат ниска патогенност и поради това се наблюдава слабо възпаление [233]. В по-късните етапи на кариозната лезия фрактурирането на неподлатения емайл води до експозиция на дентина за слюнката. В този момент микрофлората по пода на кариозната лезия става бързо смесена. Бактериите от слюнката

предизвикват остро възпаление, с инфилтрация на клетки на възпалението в ЗП. Поради това е много важно при лечението на зъбен кариес подът на кавитета да е винаги добре изолиран от слюнката.

След експериментален период на херметично запечатване на кавитета остатъчните стрептококи и лактобацили не показват признаци на растеж [77, 78]. Намаляването на броя на *S. mutans* и лактобацилите по време на лечението говори за значително намаляване на киселинната продукция и за стопиране развитието на кариозната лезия. Бързото прогресиране на активна кариозна лезия затруднява защитния механизъм на тубуларната склероза, която е важен фактор на резистентност на дентина спрямо прогресирането на кариозния процес. Смята се, че при херметично запечатване на кавитета етапите на възстановяване на дентина се осъществяват в различни времеви интервали, като първата стъпка е увеличаване на минералното съдържимо, последвано от интертубуларна и интрафибриларна колагенна реминерализация, водеща до възстановяване на микротвърдостта. Оздравителен процес в ЗП настъпва само когато тя е възпалена, но не инфектирана [3].

Дебелината и пропускливостта на остатъчния надпулпен дентин играят важна роля при предпазване на зъбната пулпа от увреждащите агенти, а също имат отношение към въздействието на лекарствените препарати, използвани при биологичното лечение. Степента на дифузия на агенти през дентиновите каналчета в зъбната пулпа е обратно пропорционална на дебелината на дентина и право пропорционална на напречното му сечение, т.е. дентинът действа като частична перфузионно-дифузионна бариера. Той е буфер, неутрализиращ протоните на киселините от самоецващите адхезивни системи, играе роля на абсорбционна среда, напр. за евгенол и цинк, бариера е за малки хидрофилни токсични молекули (НЕМА,

TEGDMA), микроорганизми, токсични бактериални метаболитни продукти [4, 52].

Защитните свойства на дентина зависят от химичния състав на веществата, които са в контакт с него. *In vivo* дентинният пермеабилитет не е константна величина. Той може да се променя при кавитетна препарация. Склеротичният дентин има хиперминерализирана повърхност и по-нисък пермеабилитет от нормалния дентин поради частично или пълно затваряне на дентиновите каналчета [52]. Големи плазмени протеини в пулпната течност като фибриноген могат да бъдат абсорбирани през стените на дентиновите каналчета, което води до понижаване на пермеабилитета на дентина. При напредване на кариозната лезия количеството на възпалителните фактори в зъбната пулпа се повишава, а при достигане до 0.5 mm остатъчна дебелина на надпулпния дентин се установява остра възпалителна реакция. Значение има и дебелината на остатъчния дентин – колкото по-голяма е тя, толкова по-слабо е възпалението [3, 52].

#### **4.7. Материали, медикаменти и допълнителни средства, прилагани при биологичните методи на лечение и влиянието им върху оздравителния процес**

Идеалният материал за директно и индиректно пулпно покритие трябва да запазва виталитета и функцията на зъбната пулпа, да образува дентинов мост, да има добри механични качества и добра адхезия към твърдите зъбни тъкани, да предпазва от микропросмукване и да е лесен за клинична употреба. Използваните материали трябва да притежават определени естетични, физични, механични характеристики, както и биосъвместимост [45, 271].

Първите опити за биологично лечение на пулпата прави Дейвис през 1922 г., като за постоянна превръзка върху ампутираната рана

поставя смес от гипс и цинков сулфат. През годините са използвани различни средства за покриване на пулпната рана: стерилни дентинови отпилки; Пулпатеk (препарат, съдържащ костен прах, дентинов прах и анестетици); сулфонамиди на прах; антибиотици; протеолитични ферменти – самостоятелно и в комбинация с диметилсулфоксид; сулфокалциево биомицинова паста; калиев нитрат. Прилагани са също хидроксилапатит, IRM, Super-EBA-цименти, адхезивни системи, ГЙЦ, Ca(OH)<sub>2</sub>-препарати, МТА, Biodentine. В литературата има данни за използване на изобутил цианоакрилат, калциев фосфат-цименти, кортикостероидни препарати, цинков оксид евгенолови цименти, EndoSequence (биокерамичен материал), както и някои експериментални препарати, като например смола, съдържаща Ca(OH)<sub>2</sub> (MTY Al-Ca & MTY Al-Ca) [3, 4, 5, 31, 35, 40, 41, 44, 45, 50, 51, 52, 68, 130, 158, 232, 265, 282].

Калций-съдържащите препарати са сочени като едни от най-добрите материали, приложими при методите на директно и индиректно пулпно покритие, поради доказаната им биосъвместимост, антибактериална активност и възможност да индуцират образуването на минерализирана бариера [4, 321]. Добри резултати и все по-широко приложение в клиничната практика през последните години показва МТА [45, 252].

Основна цел на прилаганите медикаменти е обезболяване, дрениране на пулпния ексудат чрез дехидриране, противовъзпалителен и стимулиращ оздравителните процеси ефект [253]. Циментите, които освобождават минерали, могат да спомогнат за реминерализацията на остатъчния по-мек деминерализиран дентин. Калцият и фосфорът биват реинкорпорирани в третирания кариес – засегнат дентин, достигайки здрав дентин [3].

Всички тези средства, използвани при биологично лечение на възпалената зъбна пулпа, освен предимства имат и доста отрицателни качества – предизвикват алергични реакции и резистентни щамове микроорганизми, недостатъчна твърдост, недобра адхезия към твърдите зъбни тъкани [3, 4].

При правилно определяне на показанията за прилагане на биологичните методи на лечение, правилна техника на работа и подходящи медикаменти настъпва оздравителен процес. Той протича едновременно в дентина и в ЗП. Образува се склеротичен, реактивен и репаративен дентин [45, 52, 67, 282]. Хистологично се доказва образуване на нов одонтобластен слой, възстановява се целостта на пулподентиновата мембрана, появява се отново зоната на Вайл. В зъбната пулпа намаляват или изчезват възпалителните клетки. На мястото на малките хеморагии и на измененията в основното вещество се отлагат калциеви соли. Наблюдават се дегенеративни изменения в нервните клончета на субодонтобластния плексус и отлагане на калциеви соли в стените на кръвоносните съдове и около тях [3]. Репаративният процес на зъбната пулпа се характеризира с ранен неутрофилен, макрофагов и фибробластен отговор, което води до депозиция на репаративен дентин или формиране на калцифициран мост от одонтобластоподобни клетки. Установено е, че физико-химичните характеристики на повърхността, към която пулпните клетки могат да се прикрепят, е критично условие за експресиране на техния одонтобластен потенциал [287]. От клинична гледна точка случаи, в които няма формиране на дентинов мост, но липсва възпалителна реакция, също не се считат за неуспешни. Ако обаче образуваният дентинов мост е с поръозна структурата, при наличие на микропроцеп между obturацията и стените на кавитета, той не е надеждна бариера, предпазваща зъбната пулпа от възпаление.

Значение за оздравителния процес има също така и микропросмукването, дължащо се на полимеризационното свиване, наличие на деминерализиран дентин, не напълно пенетриран от адхезивната смола (нанопросмукване), сенсibiliзиране, термични промени [96, 255].

Различни физикални средства (лазер, микровълни, УВЧ, йонофореза и др.), използвани с утвърдени методики в денталната физикална терапия, имат подпомагащо значение при щадящото лечение на възпалителните заболявания на зъбната пулпа и в комбинация с основните методи на лечение повишават процента на успеваемост [16, 32, 35, 36, 282]. Така например докато при традиционното биологично лечение процентът на успеваемост е 60%, при комбинирането му с лазерно облъчване той се повишава до 90% [46, 47, 283].

## **5. Лазерно лъчение и фотосенсибилизатори – средства, подпомагащи оздравителните процеси при индиректно пулно покритие**

### **5.1. Лазери**

#### *5.1.1. Нискоенергийни лазери*

Лазерното лъчение представлява неинвазивен, немедикаментозен метод за лечение. Първата лазерна система е разработена от Теодор Майнман през 1960 г. [188]. Днес лазерите намират широко приложение в почти всички области на денталната медицина. Прилагането им в клинични условия изисква познаване на степента на проникване на лазерното лъчение в различните тъкани на човешкия организъм с цел правилно дозиране на облъчването при използване на терапевтичното въздействие на лазерната светлина. Въпреки че съществуват утвърдени, общовалидни правила за работа с лазерното лъчение, изборът на вида лазер, както и настройката на параметрите на

лазерното лъчение е строго индивидуално в зависимост от диагнозата, стадия на заболяването и др.

Разработени са различни видове нискоенергийни лазерни системи – дефокусиран рубинов лазер ( $\lambda=694$  nm), InGaAlP лазер ( $\lambda=633\text{--}700$  nm), GaAlAs ( $\lambda=780\text{--}890$  nm), GaAs ( $\lambda=904$  nm), дефокусиран CO<sub>2</sub> лазер ( $\lambda=10.6$   $\mu\text{m}$ ), дефокусиран Nd-YAG-лазер ( $\lambda=1064$  nm), He-Ne-лазер ( $\lambda=632.8$  nm), при който до  $50$  mW/cm<sup>2</sup> плътност на мощността се стимулира клетъчната пролиферация, а над  $100$  mW/cm<sup>2</sup> – се потиска (фототоксичен ефект) и др. [8, 19, 21, 48, 132, 285, 297]. Част от тях са с историческо значение.

Основни характеристики на лазерното лъчение са: монохроматичност, кохерентност, насоченост и яркост. Лазерите притежават стимулиращо действие, ускоряват микро- и лимфоциркулацията, ускоряват дренажа и намаляват натиска при оток, намаляват локалната хипоксия, която е една от причините за болка в зъбната пулпа. Притежават противовъзпалително, антиексудативно действие, ускоряват обмяната на веществата и синтеза на нуклеинови киселини, стимулират клетъчния и хуморален имунитет, имат стимулиращ ефект върху оздравителния процес на раните, водят до ускорена фибробластна пролиферация, регенерация на костта, повишена продукция на колаген и повишена ензимна активност, спомагат за интеграцията на имплантирания биоматериал [7, 8, 46, 47, 48, 285].

Контраиндикациите за използването на лазерното лъчение са фотосенсибилизацията и фотоалергията, туморите в областта на главата и врата, левкоплакията, промените с пролиферативен характер в устната кухина, папиломатозите, хиперкератозите, ромбоидният глосит, туберкулозните заболявания.

Лазерните методи са ефективни за повишаване на успеваемостта при биологичните методи на лечение. Лазерният лъч има стерилизиращо повърхността бактерицидно действие, премахва замърсяващия слой, води до зарастване с белег в резултат на термичния си ефект, което допълнително помага за предпазване на зъбната пулпа от бактериална инвазия и стимулира директно формирането на защитен дентин [18, 20, 38].

При традиционното биологично лечение процентът на успеваемост е 60%, докато при комбинирането му с нискоенергийно лазерно лъчение той се повишава до 90% [46, 47, 283]. Проведени научни експерименти с различни видове лазери доказват следните проценти на успеваемост при щадящите методи на лечение, при равни други условия и спазени всички индикации за приложение на съответния лечебен метод:

1. Прилагане на  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  самостоятелно – 63% успеваемост (за по-възрастни пациенти – 50% ).

2. Прилагане на  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  в комбинация с Er:Cr:YSGG – 80% успеваемост.

3. Прилагане на  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  в комбинация с Er:YAG – 75% успеваемост (70% при по-възрастни пациенти).

4. Прилагане на  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  в комбинация с  $\text{CO}_2$  лазер – 93% успеваемост (89% при по-възрастни пациенти) [282, 283].

Биостимулиращият ефект на лазерите представлява съвкупност от структурни, биохимични и функционални промени, които се наблюдават в живите организми под действие на нискоенергийно лазерно лъчение [161]. При лазерно облъчване се установява термичен ефект, повишаващ температурата в интрацелуларната течност и подпомагащ протичането на окислително-редукционните процеси. Повишаването на температурата води също до разширение на

артериите и вените и локална хиперемия, намалява болката, чрез оток на ексудата и намаляване на освобождаването на субстанции като хистамин, брадикинин, простагландин, К- и Н-йони, има противовъзпалителен ефект. При прилагане на лазерно лъчение е доказан също електричен (промени в йонния метаболизъм на клетките) и фотохимичен ефект, активиране на различни ензими (каталаза, дехидрогеназа, аденил-циклаза), промени във функционалната активност на клетките, ускоряване на биоенергетичните и биосинергетичните процеси, ускоряване на митотичната активност на клетките [46, 47, 168].

Точният механизъм на действие на лазерната светлина не е установен. Смята се, че в клетките и тъканите съществуват електромагнитни полета и свободни електрични заряди, които се преразпределят под влияние на енергията на излъчването на нискоенергийното лазерно лъчение. По този начин се осъществява т.нар. резонансна стимулация на биологичните процеси в тъканите [7, 46, 285]. Нискоенергийното лъчение от червения и близкия до него инфрачервен спектър отговаря точно на съответните характерни енергийни и абсорбционни нива в дихателната верига, което доказва, че то въздейства директно стимулиращо върху компонентите на т.нар. антенни пигменти на дихателната верига и има като непосредствена последица компенсация на енергийната недостатъчност на клетката чрез повишаване на митохондриалното производство на аденозинтрифосфат (АТФ). Този вид стимулация може да бъде определен като биологичен ефект на резонанса. Компонентите на антенните пигменти (електронните преносители) се явяват като вид резонатори с различна големина и форма, които отразяват електромагнитното лъчение и трансформират функционално енергията

му, т.е. те я правят полезна за регулационните процеси на клетката [7, 46, 285].

Под влияние на нискоенергийното лазерно лъчение в клетката, в зависимост от степента на нейната фоточувствителност, възниква фотодинамичен ефект. Той се изразява в активиране на ядрения апарат на клетката и системата ДНК–РНК–белтък, съпроводено с активиране на синтеза на белтъка в рибозомите. При облъчването се повишава активността на ферментите от цикъла на Кребс (цитохромоксидазите) и се засилва усвояването на  $O_2$  от клетките. С нарастването на биоелектрическият потенциал на клетките се създават условия за активиране на всички клетъчни органели и функции на клетката като цяло. Това води до повишаване на тяхната резистентност спрямо въздействията на патогенните фактори. Морфологията на тези процеси се проявяват с повишаване на митотичната активност, с активиране на процесите на размножаване на клетките, с физиологична и репаративна регенерация [7, 46, 47, 160, 161, 185].

Биостимулиращият ефект на лазерното лъчение се определя от големината на абсорбираната светлинна енергия, т.е. зависи от внесената енергия. Колкото по-голяма е проникваемостта на тъканта, толкова по-малка е абсорбцията и по-слаб е биологичният ефект. Прониквателната способност, представена от физичната величина проникваемост, се влияе от отражението на светлината от повърхността на различните среди, от пречупването на лъчи при преминаване от една среда в друга, от разсейването на светлината от тъканните частици, от възможността на отделните тъкани да поглъщат лазерното лъчение и др. [7, 46, 48, 285]. При биологичните тъкани абсорбцията се осъществява от наличните свободни водни молекули, пигменти, протеини и др. макромолекули. Коефициентът на абсорбция зависи най-вече от дължината на вълната. От твърдите зъбни тъкани с най-

голяма проницаемост е емайльт, на второ място е дентинът. Пропускането на светлинна енергия през дентина е 0.2–0.8%, а през емайла – 0.5–1.5% [46]. Трябва да се вземе предвид, че внесената енергия в устната кухина намалява в различна степен, тъй като средата е влажна и има голяма способност да разсейва и рефлектира лазерното лъчение.

Дълбочината на проникване на лазерно лъчение с  $\lambda=630\text{--}700\text{ nm}$  е 0.2–1 cm, като за He-Ne лазер е 2–20 mm. Дълбочината на енергийната пенетрация зависи от редица фактори – дължина на вълната, оптични и температурни характеристики, мощност, стойности на енергията, време на експозицията, оптични характеристики на тъканта [46, 48, 285]. Особено силен терапевтичен ефект се установява при лъчение с дължина на вълната в областта от 600 до 750 nm (червен спектър), докато поглъщането на светлината е минимално от синята спектрална област [46, 48, 285].

Различията в пролиферативната активност, наблюдавани в отделните групи клетки, показват ясна зависимост от характеристиките на лазерните лъчеви импулси. Разликите при отделните клетъчни популации биха могли да се обяснят с различия в техните потенциални възможности за пролиферативен отговор, който вероятно зависи от митотичните процеси в тези клетки, а също така и от чувствителността им към прилаганите дози на облъчване [160, 161].

### *5.1.2. Високоенергийни лазери*

Високоенергийните лазерни системи се въвеждат в денталната практика на по-късен етап. Намират широко приложение в денталната медицина за отстраняване на меки тъкани, дезинфекция на коренови канали в ендодонтията, при биологичните методи на лечение. Алтернатива са на високооборотните наконечници в оралната и лицево-челюстната хирургия за отстраняване на кост, използват се за

препарация на всички класове кавитети при временни и постоянни зъби, отстраняват неметални obtурации (композиционен материал, глас-йономерен цимент, компомер) [54, 297]. С тях не могат да бъдат премахнати метални (амалгамени, златни и др.) и порцеланови obtурации, но след отстраняването им лазерът може да се използва за премахване на вторичния и/или остатъчния кариес под тях [174, 275]. Интерес при биологичните методи на лечение представлява възможността на лазерните системи за кавитетна препарация, антибактериалният им ефект, намаляването на микропросмукването, както и директният им стимулиращ ефект върху ЗП [240, 250, 282].

Възможността за по-бърза, ефективна, консервативна и безболезнена препарация на твърдите зъбни тъкани, с минимален увреждащ ефект върху зъбната пулпа дълги години е обект на проучване от страна на изследователите. С усъвършенстването на денталните технологии, като алтернатива на конвенционалните високо- и нискооборотни наконечници за отстраняване на кариозна маса от ТЗТ и кавитетна препарация са разработени различни методи и системи – въздушна абразия, звуково отстраняване на ТЗТ, лазери [45, 52, 54, 91, 220].

Използването на лазери при отстраняване на кариозна тъкан и кавитетна препарация притежава редица предимства: редуцират дискомфорта на пациента, намаляват болката (използва се много малко количество анестетик или се работи без локална анестезия), редуцират шума, вибрациите, стреса, водят до по-прецизно отстраняване на кариозната тъкан (при препарация с конвенционален борер кавитетите са винаги по-широки от границите на кариозната лезия, а ятрогенните увреждания с борер на здрави участъци от зъба са отговорни за развитието на нова кариозна лезия) [63]. Целта е да се разработи „кариес-селективна система”, която да отстранява само кариозната

субстанция и да щади здравите ТЗТ. Предимства на лазерната кавитетна препарация са също получаване на повърхностна морфология, благоприятстваща връзката с композиционния материал, намаляване на пермеабилитета на ТЗТ, което води до повишаване на резистентността им спрямо киселини, притежават антибактериален ефект и отстраняват замърсяващия слой от дъното и стените на кавитета [23, 140, 167, 213, 231, 266]. При проведени изследвания 80% от пациентите намират препарацията с лазер по-комфортна от тази с конвенционален борер [254].

Като недостатъци на лазерното лъчение може да се посочат неприятният звук и миризма при работа, както и липсата на пълен обезболяващ ефект при някои от клиничните случаи.

Лазерите, използвани за кавитетна препарация в денталната медицина, са два основни вида:

1. Er:Cr:YSGG лазер ( $\lambda=2780$  nm, с активна среда от твърд кристал – итрий-скандий-галий-гранат с примеси от ербий и хром).

2. Er:YAG лазер ( $\lambda=2940$  nm, с активна среда итрий-алуминий-гранат с примеси от ербий). Първата Er:YAG лазерна система (Kavo Key Laser) е представена на медицинския пазар в Германия през 1992 г. [91, 105, 169].

И при двата вида лазери лъчението е в средната инфрачервена, невидима, нейонизирана част на спектъра, поради което винаги е необходим пилотен лъч във видимата червена област, който терапевтично не действа, но дава възможност на оператора да се ориентира за посоката на инфрачервеното лазерно лъчение [8].

Механизмът, по който се осъществява отстраняване на ТЗТ с Er-лазери, все още не е напълно изяснен. Има множество хипотези, повечето от които не са получили научно потвърждение (дехидратация на тъканите, хидрокинетичен механизъм на действие и др.) [148]. Днес

се смята, че всички Er-лазери имат еднакъв фототермомеханичен механизъм на действие, който се изразява в бързо подповърхностно изпарение на интерстициално включената вода в минералните субстрати, което води до масивна експанзия на обема и това разширение причинява експлозивното отстраняване на околните материи [222]. Разграничават се два етапа в лазерната кавитетна подготовка – изпаряване и микроексплозии [163].

Обнадеждаващите резултати от изследванията на Er-лазерните системи се допълват и от стимулиращото въздействие на лазерното лъчение върху оздравителните процеси в зъбните тъкани [283]. Установено е, че Er:YAG лазерът води до по-ранно започване и завършване на пулпната регенерация в сравнение с бързооборотния наконечник [278]. По-бързо се образува дентинов мост и има по-голямо количество репаративен дентин. Подобни резултати са установени и при Er: Cr: YSGG аблацията. Изследванията посочват различни срокове за образуване на репаративен дентин след подготовка с Er:YAG лазер – 14 дни, 28 дни, 3–5 седмици [165, 257, 278]. Оздравителният процес се оценява чрез проследяване на calcitonin gene-related peptide (CGRP) имунореактивни фибри (CGRP е неврпептид, който е широко представен в ЗП, взема участие в оздравяването на увредената пулпа и неврогенното възпаление, причинено от нервно дразнение). Наблюдава се повишаването им в по-голяма степен и по-рано отколкото при зъби, препарирани с турбина, като 7 дни след подготовката количеството на тези фибри намалява и на 21-вия ден достига до контролното ниво [86, 278].

Все още няма единно становище по въпроса дали Er:YAG-лазерът води до редуция на микропросмукването и развитие на вторичен кариес. Установено е, че след третиране на ТЗТ с лазер се повишава здравината на връзката им с композиционния материал [23,

88, 300]. Други изследвания доказват, че микропросмукването, при кавитети, препарирани с лазер, е по-голямо от това при препарация с борер и последващо киселинно ецване. Като причина се посочва непълната аблация на емайловата повърхност [63, 92, 180, 246, 294]. Микропросмукване може да се получи на едно от следните места: през хибридният слой, между хибридният слой и КМ и през КМ. При кавитет, препарирани с лазер и след това obtурирани, големината на микропросмукването зависи от редица условия: избор на лазерните параметри, вид на obtуровъчния материал, кавитетна форма, образуване на хибриден слой за КМ.

Високоенергийните лазерни системи притежават изразен бактерициден ефект [17, 148]. Лазерното лъчение се абсорбира от водата в бактериалните клетки, след което се стига до изпарение на водата, както при аблацията на твърдите тъкани. Някои автори използват бактерицидния ефект на Er-лазерите само за редукция на количеството микроорганизми в дентиновите каналчета преди поставяне на obtурацията при кавитетна препарация с конвенционални борери. Използването на лазер със средни стойности на мощността 2–3 W може също ефективно да премахне размазания пласт от дентина и да остави дезинфекцирана повърхност за адхезивната система, тъй като е установена по-голяма редукция на микроорганизми при препарация с лазер, в сравнение с тази с конвенционален наконечник.

Дълбочината на проникване на лазерното лъчение е физично определена интензивност на лъча, която съдържа точно 36% от мощността на излъчването на повърхността преди навлизането в тъканта. При Er-лазери дълбочината на пенетрация е само няколко микрометра – 7  $\mu\text{m}$  в емайла и 5  $\mu\text{m}$  в дентина [7, 148, 236, 274]. Някои автори установяват, че при работа с импулс 300  $\mu\text{s}$  на сухо дълбочината на проникване е 50  $\mu\text{m}$ , а при работа с водно охлаждане – 250  $\mu\text{m}$  [153].

Ефективността на всяка лазерна система зависи от дължината на вълната, от броя импулси за секунда, енергията за един импулс и от продължителността на облъчване [105]. С повишаване на ефективността обаче нараства рискът от нежелани странични ефекти като термично увреждане на ТЗТ и ЗП и фототоксичност. За да се снижи до минимум този риск, е необходимо всички параметри да се съчетаят така, че да се постигне оптимален комбиниран терапевтичен ефект [203].

Установено е, че Er:YAG лазерът има висока аблативна ефективност и малък термичен ефект [148, 150, 165]. Изследвания доказват, че няма статистически значима разлика в повишаването на температурата при кавитетна препарация с лазер и с турбина, когато се използва подходящо водно охлаждане [171]. Установено е, че повишаването на температурата при препарация с Er:YAG лазер води до по-слаби термични увреждания в сравнение с CO<sub>2</sub> – и Nd:YAG лазери [309]. Ограниченото повишаване на температурата в прилежащите тъкани се обяснява с това, че доставената енергия се елиминира в по-голямата си част от водната пара, а и скоростта на аблация е такава, че много малко количество топлина има възможност да се транспортира към околните тъкани [8, 84]. Високата абсорбционна ефективност на лъчението на Er:YAG лазерът във водата и хидроксилапатита, водеща до микроексплозии, предпазва околните тъкани от значителни странични термични ефекти. Все пак известна топлинна генерация е неизбежна, защото Er:YAG лазерът излъчва в средната инфрачервена област, а е доказано, че термичният ефект се повишава с увеличаване на дължината на вълната [63].

При значително повишаване на температурата в ТЗТ се наблюдават нежелани промени – модификация на неорганичните компоненти и образуване на нови минерални фази (некристален

калциев фосфат), промяна на чувствителността спрямо киселини (повишена устойчивост при ецване), образуване на слабо закрепени слоеве от тъканта, които се отделят при ецване и водят до нарушаване на връзката с адхезива и КМ [123].

Повишаването на температурата и термичният ефект на лазерното лъчение върху зъбната пулпа са изследвани от редица автори. Установено е, че при повишаване на температурата над  $5.6^{\circ}\text{C}$  се наблюдава загуба на виталитета на ЗП в 15% от зъбите [328]. Някои автори доказват необратими промени в ЗП при температурно повишение с повече от 6 или със  $7^{\circ}\text{C}$  [62, 121, 258]. Други установяват промени във влакната и некроза при покачване на температурата с  $10^{\circ}\text{C}$  [138]. Обобщените резултати показват, че повишаването на температурата с повече от  $5.5\text{--}6^{\circ}\text{C}$  води до необратими промени в ЗП [62, 127]. При хистологични изследвания е установено, че при работа с Er-лазер промените в ЗП са минимални, локализирани, обратими и сравними с тези при конвенционалната подготовка [63, 148, 216, 263, 264]. Промените са свързани с дезорганизация на одонтобластния слой от страната на облъчването и/или слаба възпалителна реакция в ЗП [263, 264]. Значение имат параметрите на работа, оптичните характеристики на тъканта и дебелината на остатъчния надпулпен дентин. В клинични условия дентин с дебелина  $0.5\text{--}1\text{ mm}$  може да се смята за лимит за защита на зъбната пулпа [244]. Поради ролята му на изолатор, колкото по-голяма е неговата дебелина, толкова по-малки са термичните изменения в околните тъканите [307]. Измерената остатъчна температура в тъканите след облъчване варира между 25 и 70% в зависимост от продължителността на импулса и дължината на вълната [125, 236]. Латералната зона на термично увреждане зависи също от параметрите на лазерното лъчение. При по-къс импулс за кратък период от време се провежда голяма енергия и се осигурява

почти равно по продължителност релаксационно време за тъканите. В този случай колатералното увреждане е минимално [124, 139, 149]. В зависимост от параметрите на облъчване латералната зона на термично увреждане може да достигне от 5 до 100  $\mu\text{m}$ , а при работа без водно охлаждане – до 25 mm [124, 275, 305].

Един от начините за намаляване на нежеланите термични ефекти, без понижаване на енергията, е покриването на оперативното поле с воден филм [42]. Установено е, че водният спрей при работа с Er-лазер трябва да бъде непрекъснат и продължителен. При увеличаване на броя на пулсациите е необходимо да се повиши количеството му, особено при използване на честота над 30 Hz [63, 93, 123, 149, 206, 301]. Водно-въздушният спрей може да се провежда по ръкохватката или да се аплицира външно от асистент [98]. Установено е, че той охлажда средата, почиства мястото на препарацията и е основен фактор, определящ ефективността на аблация на емайла и дентина [64, 84, 88, 153, 225]. Изследвания показват редукция между 10 и 50% на температурата при облъчване при използване на воден спрей [125, 236].

## **5.2. Фотоактивирана дезинфекция**

Все по-често срещаната резистентност на различни микроорганизми към антибиотиците, като метицилин-резистентни щамове на *Staphylococcus aureus* и ванкомицин-резистентни щамове на *Enterococcus faecalis*, стимулира разработването на нови методи за антимикробна терапия. Такава алтернатива е фотоактивираната дезинфекция [145, 171, 214, 299, 302, 318, 330]. Тя представлява метод за третиране на патогени (бактерии, гъбички и вируси) и туморни клетки, включващ използването на фотоактивно багрило – фотосенсибилизатор, което се активира от светлина с определена дължина на вълната в присъствието на кислород [9, 95, 173].

Трансферът на енергия от активния ФС към наличния кислород води до формирането на силно токсични кислородни форми, като свободни радикали и синглетен кислород ( $^1\text{O}_2$ ), които дезактивират патогените. ФАД е минимално инвазивен и високоселективен метод, насочен срещу точно определени клетки (бактерии, гъбички, вируси, тумори), тъй като всеки ФС има свойството да ги разпознава и да се натрупва в големи количества в тях [217, 329]. Развитието на резистентност към ФАД е малко вероятно, тъй като в микробната клетка синглетният кислород и свободните радикали взаимодействат с различни клетъчни структури и по различни метаболитни пътища [104, 298]. Фотодинамичната терапия (ФДТ) е еднакво ефективна срещу МО, резистентни и чувствителни на антибиотици [329]. Повторното фотооблъчване не води до възникване на резистентни щамове [9].

### *5.2.1. Приложение*

ФДТ се прилага в медицината най-често при лечението на карциноми, включително тези в областта на главата и шията, на белите дробове, на пикочния мехур, както и при всички видове рак на кожата. Използва се с успех при неракови заболявания, като възрастова петниста дегенерация на кожата, ревматоиден артрит, актинова кератоза и псориазис и др. [173].

Прилага се и като алтернативно антибактериално, антигъбично и антивирусно лечение. Намира приложение при стерилизация на кръвна плазма и вода с цел отстраняване на вируси и бактерии.

За пръв път ФДТ се прилага в устната кухина в средата на 80-те години на миналия век, като днес намира все по-широко приложение. Включена е в лечението на орални карциноми, както и на бактериални и гъбични инфекции (най-често орални кандидози). Прилага се за фотодинамична диагностика на злокачествени трансформации на оралните лезии, като допълваща терапия към нехирургичното лечение

на пародонтитите, при ендодонтското лечение, за дезинфекция на протезни конструкции, отпечатъци и гипсови модели [104, 298]. Търсят се приложения на ФДТ при профилактиката на зъбния кариес.

Методът е приложим при сравнително повърхностни процеси с ограничена площ [142].

### *5.2.2. Механизми на фотосенсибилизация*

Съществуват два типа реакции, чрез които фотосенсибилизаторът, намиращ се във високо енергийно състояние, взаимодейства с биомолекулите [198]. Първият тип включва продуцирането на йони директно от ФС и образуването на свободни радикали. Те реагират бурно с наличния кислород и се превръщат във високореактивни, силно токсични кислородни форми (супероксид, хидроксилни радикали, водороден пероксид). Вторият представлява продуциране на високореактивна фаза на кислорода, известна като синглетен кислород ( $^1\text{O}_2$ ) [108]. При провеждането на ФДТ е трудно отдиференцирането на двата типа реакции. Най-често протичат в комбинация, в зависимост от концентрацията на ФС и налягането на кислорода [104, 191, 298]. ФДТ има цитотоксичен ефект, който се изразява във фоторазрушаване на клетъчните органели и молекули. Като прицелни обекти се считат митохондриите, клетъчните мембрани, лизозомите, ядрата на туморните клетки и кръвоносните съдове на туморите [144, 217].

### *5.2.3. Фотосенсибилизатори*

Фотосенсибилизиращ потенциал имат стотици естествени и синтетични вещества [27, 142, 173, 195]. Първото вещество, използвано като фотосенсибилизатор, е акридин оранж (Raab, 1900) [101, 242, 277].

Идеалният ФС трябва да отговаря на няколко условия:

– да бъде биологично поносим за нормалните здрави тъкани [173];

- да проявява минимална или никаква токсичност „на тъмно” спрямо патогенните клетки и да се активира в резултат на облъчване със светлина;
- да има относително постоянен състав;
- да се елиминира бързо от организма;
- да проявява висока абсорбция спрямо светлина с определена дължина на вълната;
- да образува голямо количество свободни радикали и/или синглетен кислород;
- да има висока селективност спрямо патогенните клетки;
- да е разтворим във вода и в биологични разтворители, което да позволява директното му интравенозно, орално или местно приложение;
- възможност за съхранение и стабилност на светлина [114].

### **Класификация на ФС според химичния състав**

#### **1. Група на багрилата**

- трициклични багрила с различни мезоатоми: акридин оранж, метиленово синьо (МВ), бенгалско розово, толуидиново синьо (ТВО);
- фталоцианини – сулфонизирани метални фталоцианини.

#### **2. Група на порфирините и хлорините**

– порфирини: порфирин дериват (Photofrin), 5-аминолевулонова киселина (5-ALA), бензопорфирин дериват (BPD), литиев тесафирин. Спектралните характеристики на порфирините не са оптимални за ФДТ, защото абсорбционният им спектър е близък до този на хемоглобина.

- хлорини: моно-L-аспартил-хлорин (NPe6), темопорфин (Foscan), калаен етилетиопурпурин (SnET2), талапорфин содиум (LS11).

### **3. Фурокумарини – псорален**

Използват се също ксантени (еритрозин) и монотерпени (азулен), както и фуларени.

#### *5.2.4. Източници на светлина*

За целите на ФДТ са използвани различни светлинни източници – конвенционални, газови разредни лампи, шрайбпроектори, халогенни, теснолентови живачни, ксенонови и LED лампи и лазери [173, 194, 217, 243]. В зависимост от локализацията и морфологията на лезията те най-често са снабдени с фиброоптичен световод, завършващ с цилиндричен дифузер или лещи за плоскостна апликация. Накрайникът на световода може да бъде с различна форма, което позволява излъчването и фокусирането в различни посоки. При ФДТ трябва да се съблюдава правилното настройване на източника на светлина и точното дозиране на ФС и светлината.

За клинично приложение се използват най-често лазери, LED и халогенни лампи (филтрирани) [172, 217, 315, 319]. Лазерите притежават редица предимства пред останалите светлинни източници – монохроматичност, висока ефективност на провеждане на светлината през фиброоптичното влакно (>90%), голяма мощност на излъчването, но цената им е по-висока [217].

Поради добрата проникваемост на човешките тъкани повечето фотосенсибилизатори се активират от червена светлина с дължина на вълната между 630 и 700 nm, което съответства на дълбочина на проникване съответно от 0.5 до 1.5 cm [142, 172, 243, 251].

При приложението на различни светлинни източници трябва да се обърне внимание на повишаването на температурата в дентина и ЗП, което може да доведе до необратими промени в тъканите. По литературни данни повишаването на температурата с 2.2°C не води до необратими промени в тъканите, докато покачване с 5.5°C води до

пулпна некроза в 15% от случаите [306, 328]. Повишаването на температурата е правопрпорционално на времето на облъчване, като значение има и режимът на излъчване – непрекъснат или пулсиращ. По-щадящ е пулсиращият режим на излъчване, който дава възможност за възвръщане на нивото на нормален кислород от синглетен, както и осигурява задържане на температурата на зъбните структури на приемливо ниво. Тъй като използваните мощности при ФДТ са много ниски, времето на облъчване е кратко, налице са тъканни течности и самите фотосенсибилизатори са под формата на течност, облъчването не предизвиква термични промени в прицелната и околните тъкани [69, 109, 218]. Повишаване на температурата може да се очаква при стойности над  $100 \text{ mW/cm}^2$  [176].

#### *5.2.5. Ефект на ФАД върху оралните биофилми*

Устната кухина е колонизирана от над 500 вида различни микроорганизми, включващи аеробни и анаеробни Грам (+) и Грам (-) бактерии, гъбички, микоплазми, протозои и вируси. Повечето от тях имат склонност да се обединяват в т.нар. биофилм. Той представлява съвкупност от бактерии в екзополисахариден матрикс, разположени върху живи и неживи повърхности. Микробиалните биофилми в устната кухина, в частност зъбната плака, са основен източник на инфекции. Бактериите формират такива структури по няколко причини:

– В сравнително стабилните условия на средата в биофилма те имат нужда от по-малко енергия за поддържане на хомеостазата си.

– Между различните видове бактерии се развиват синергични взаимоотношения.

– В структурата на биофилма микроорганизмите са по-устойчиви на външни влияния (бактерицидни вещества химиотерапевтици,

дезинфектанти, антибиотици), на което се дължи и антибиотичната резистентност на някои щамове.

– В биофилма се извършва генетичен обмен и междуклетъчна комуникация. При намаляване на броя на бактериите в средата се продуцират сигнални молекули, които свободно преминават през бактериалните стени и активират транскрипцията в рибозомите, като по този начин стимулират размножаването на клетките.

Биофилмът е изграден от различни клетки и клетъчни агрегати, екзополизахариден матрикс, празнини и водни канали. Последните два компонента имат значение за дифузията на хранителни вещества и отпадни продукти. Зъбната плака, като частен случай на биофилм, се състои от бактериални клетки, бактериални ензими, бактериални метаболитни продукти, слюнчени протеини, имуноглобулини IgG, IgA и съставки на комплемента.

Две са най-често срещаните орални заболявания с бактериална етиология – зъбният кариес и пародонтитите. Механичният контрол на зъбната плака, добрата орална хигиена и прилагането на антимикробни агенти са част от конвенционалната им терапия. Като допълваща може да се използва ФДТ, която е високоселективен антимикробен метод [154]. ФАД променя структурата на биофилма, той изтънява и се установява загуба на биомаса [269]. Редица изследвания доказват ефекта на ФДТ спрямо различни МО [132, 197, 198, 239, 267, 296, 325]. Биофилми от *Streptococcus mutans* се облъчват със светлина с дължина на вълната от 500–680 nm в присъствието на еритрозин, метиленово синьо и Photofrin [79, 133, 209, 212, 318]. Толуидиново синьо се прилага също като ФС при биофилми на *Streptococcus mutans* и се третира с червена светлина [61, 94, 118, 311]. Изследвана е и антимикробната активност на еозин, малахитово зелено, роуз бенгал [247]. Всички приложени препарати показват добра антибактериална активност и

дозозависим ефект. Lima и кол. (2009) обобщават, че ефективното унищожаване на *Streptococcus mutans* чрез ФАД дава основание методиката да се използва като техника за елиминиране на МО от дентина преди obtуриране на кавитета [179].

Развитието на резистентност към ФДТ е малко вероятно поради разнообразните механизми на действие и различните прицелни точки на кислородните радикали и синглетния кислород. Някои бактериални ензими (каталаза, супероксид дисмутаза, пероксидаза) могат да инактивират високореактивните кислородни радикали и да прекъснат реакция тип I при ФАД. Синглетният кислород ( $^1\text{O}_2$ ) обаче, не е радикал, не се повлиява от ензими и участва в тип II реакция на ФДТ по различни механизми [173]. Има единични съобщения, че той може да инактивира бактериалните ензими, но е възможно да се повлияе от антиоксиданти [101, 132, 243].

#### 5.2.6. Фотоактивирана дезинфекция при зъбен кариес

Зъбният кариес е едно от най-често срещаните хронични заболявания в света, което засяга 60–90% от децата в училищна възраст и почти 100% от възрастното население [238]. Той е резултат от взаимодействие между патогенни микроорганизми (напр. *S. mutans*), които метаболизират хранителни карбохидрати и образуват киселини [4, 227, 259]. В последните години ФАД е изучавана като алтернативен метод на действие срещу основния етиологичен фактор за развитие на зъбния кариес, като проведените експерименти показват обещаващи резултати относно инактивирането на микроорганизмите. Тъй като кариесът е локализирана инфекция, ФС може да бъде поставен в лезията със спринцовка, а светлината може да бъде насочена чрез оптично влакно [312].

Редица изследвания използват различни протоколи на работа, като експериментите са насочени основно към определяне на

оптималната доза ФДТ при зъбен кариес. Работи се в три основни направления:

1. Проучване на характеристиките на ФС и тяхното действие върху Грам (+) и Грам (-) микроорганизми [75, 79, 133, 178, 190, 234, 311, 313, 330].

2. Определяне на точния източник на светлина, с цел максимална абсорбция от багрилото и оптимален лечебен резултат [315].

3. Изследване на връзката между концентрацията на ФС и възможността за образуване на агрегати и ефективността на светлинния източник.

Установено е, че някои групи ФС са по-ефективни към Грам (+), а други – към Грам (-) микроорганизми. Съществуват и ФС, които могат да променят своя абсорбционен максимум в зависимост от концентрацията си [217].

Основните микроорганизми, които се свързват с ранното развитие на зъбния кариес, са групата на *Streptococcus mutans* (специално *S. mutans* и *S. sobrinus*) и лактобацилите [293]. При напредване на кариозната лезия в дълбочина се наблюдава развитие на анаеробни микроорганизми, както и преход от преобладаващо факултативни Грам (+) микроорганизми, към облигатни анаероби – коки и пръчици и Грам (-) пръчици. Най-често изследваният микроорганизъм във връзка с развитието на зъбния кариес е *S. mutans*, но са изследвани още *Lactobacillus acidophilus*, *S. sobrinus*, *S. sanguinis*, *Actinomyces naeslundii*. Смята се, че най-голяма ефективност срещу *S. mutans* и други Грам (+) микроорганизми има еритрозинът. Той е хидрофилен, притежава фотодинамичен ефект в ниски концентрации и се активира се от светлина с дължина на вълната 530 nm, която може да бъде произведена от LED източник.

Оптималният ефект на ФДТ зависи от структурните особености на бактериалната мембрана, концентрацията на ФС, неговата разтворимост и поляритет, източника на светлина и неговата дължина на вълната. Важно значение има възможността на ФС да взаимодейства с бактериалната мембрана, вероятността ФС да пенетрира и действа вътре в клетката, както и образуването на реактивен синглетен кислород около бактериалната клетка при облъчване на ФС.

Механизмът на свързване на ФС към клетъчната мембрана е различен при Грам (+) и Грам (-) микроорганизми. Разликата може да бъде обяснена със структурни особености на клетъчните стени, както и с хидрофобността и заряда на самите ФС. При Грам (-) микроорганизми се установява комплекс от два липидни слоя от външната страна на клетъчната мембрана, който действа като физична и функционална бариера между клетката и околната среда, докато Грам (+) микроорганизми притежават дебела мембрана, която е относително пропусклива. Вероятно е този относително поръзен слой от пептидогликани и липотейхоева киселина от външната страна на мембраната на Грам (+) микроорганизми да позволява на ФС да дифундира във вътрешността, докато Грам (-) микроорганизми като цяло са по-резистентни на ФДТ поради наличието на защитна външна мембрана [173, 189, 217].

Освен тези структурни различия, зарядът на ФС може да окаже влияние върху инактивирането на Грам (+) и Грам (-) микроорганизми. Смята се, че при физиологично рН неутралните и анионните съединения, като роуз бенгал, еритрозин, еозин, порфиринови деривати (Photofrin<sup>TM</sup>, Photosan<sup>TM</sup>, Photogem<sup>TM</sup>), алуминиев дисулфонатен фталоцианин се свързват ефективно и инактивират Грам (+) микроорганизми, докато при Грам (-) микроорганизми тези ФС се

свързват с външната мембрана, но не са ефективни за инактивиране на клетките при облъчване [217].

За разлика от тях катионните ФС, като метиленово синьо, толуидиново синьо, пиридиниум Zn (II) фталоцианин са в състояние да инактивират както Грам (+), така и Грам (-) микроорганизми. Тези положително заредени багрила могат да се свързват с полифосфатите по външната повърхност на микроорганизмите и да доведат до увреждане на липидите и протеините на клетъчната мембрана чрез мембранно свързани ензими [288]. Следователно при Грам (+) микроорганизми успешно могат да бъдат прилагани катионни и анионни багрила, докато при Грам (-) микроорганизми по-добра ефективност имат катионните ФС [217].

Друг механизъм на действие на положително заредените ФС е преминаването през клетъчната мембрана, свързването с отрицателно заредените митохондрии и директното въздействие върху тези органели [304]. Навлизането и действието на ФС вътре в прицелната клетка е възможно, но зависи от хидрофилността и разтворимостта на багрилото, които определят възможността му за преминаване през клетъчната стена [288]. Грам (+) микроорганизми предпазват своята цитоплазмена мембрана с дебел слой многопластови пептидогликани, които блокират преминаването на хидрофобни компоненти поради наличието на аминокиселини и захари в клетъчната мембрана. Следователно само хидрофилни компоненти могат да преминат през нея.

Обратно, Грам (-) микроорганизми имат един или няколко слоя пептидогликани и външна мембрана. Поради липопротеиновия характер на мембраната е необходим специален механизъм за навлизане на хидрофилни молекули, напр. наличие на пори.

Следователно тук се очаква хидрофобните компоненти да навлизат по-лесно от хидрофилните.

ФС могат да бъдат хидрофилни, хидрофобни или с двойствен характер. Смята се, че роуз бенгал, метиленово синьо и толуидиново синьо имат двойствен характер (хидрофилен и хидрофобен), еритрозинът е хидрофилен, фталоцианините и порфириновите деривати са хидрофобни [217, 304].

По литературни данни съществува и трети тип механизъм за инактивиране на микроорганизми, при който ФС не навлиза в клетката и не е в контакт с нея [100, 217]. Смята се, че в този случай се касае за образуване на синглетен кислород ( $^1O_2$ ) в близост до външната клетъчна мембрана, който води до деструкция на виталните структури. Времето на полуживот на синглетния кислород зависи до голяма степен от околната среда, а ако е в разтвор – от вида на разтворителя. Във вода полуживотът му е 4  $\mu$ s, а в биологичните системи е твърде кратък – по-малко от 0.04  $\mu$ s, което ограничава радиуса му на действие до около 0.02  $\mu$ m [113, 217]. Следователно постигането на терапевтичен ефект не изисква непременно пълен афинитет на ФС и клетъчната стена, тъй като наличието на реактивни продукти (като синглетен кислород) би осигурило терапевтичен успех и без директен контакт между микроорганизма и ФС. Смята се, че всяко багрило отделя различно количество синглетен кислород при активиране със светлина. По литературни данни: фталоцианинови деривати – 0.56; метиленово синьо – 0.59; толуидиново синьо – 0.60; еритрозин – 0.63; роуз бенгал – 0.76; хематопорфиринови деривати – 0.83 [107]. Най-голяма фотодинамична активност се наблюдава при освобождаване на най-голямо количество синглетен кислород. Трябва да се има предвид обаче, че тези стойности могат да бъдат различни в зависимост от факторите на биологичната система [217].

### *5.2.7. Недостатъци на ФАД*

Прилагането на ФДТ в клинични условия изисква определяне на оптимална доза и разработка на точен клиничен протокол с цел избягване на нежелани странични ефекти – цитотоксичност, фототоксичност, термично увреждане.

Изискване към субстанциите, използвани като ФС, е да имат малка или да нямат тъмнинна цитотоксичност [196]. Някои вещества обаче могат да станат токсични при излагане на светлина и това да отключи нежелан биологичен страничен ефект [201]. Редица изследвания доказват наличие на дозозависима цитотоксичност на ФС при ФАД [137, 162, 175, 234], поради което определянето на оптимална концентрация е от първостепенно значение за предпазване на ЗП, особено при дълбоки кариозни дефекти. Изборът на светлинен източник пък трябва да бъде съобразен с абсорбционния максимум на ФС, а параметрите на облъчване да не предизвикват нежелан термичен и фототоксичен ефект.

Често срещан проблем при ФДТ е склонността на багрилата да образуват агрегати във водна среда, което намалява терапевтичния ефект на метода [103, 217]. Формирането на агрегати променя абсорбционния спектър и фотофизичните характеристики на багрилата, повлиява тяхната възможност да абсорбират определена дължина на вълната или да действат като фотосенсибилизатори, както и намалява продукцията на синглетен кислород [217, 292]. Агрегация се наблюдава, когато концентрацията на веществата се увеличи, особено при хидрофобните багрила. Образуват се димери, олигомерни или високомолекулни самоагрегиращи се форми, чийто абсорбционен максимум се различава от този на мономерите [73]. Така например мономерът на метиленово синьо има абсорбционен максимум 660 nm, докато димерът – 610 nm; мономерът на толуидиново синьо – 630 nm,

докато димерът – 590 nm; еритрозин мономерът – 530 nm, димерът – 510 nm; фталоцианиновите деривати мономери – 660 nm, димерите – 600 nm; порфириновите деривати мономери – 630 nm, димерите – 600 nm [217, 289].

При ниска концентрация преобладават мономеричните форми и абсорбционният максимум е в зоната на ултравиолетовия спектър. Багрилата образуват агрегати по-често във вода, отколкото в органични разтворители и в разтвори с голяма концентрация на соли. Особена склонност към формиране на димери и агрегати се наблюдава при фталоцианиновите деривати. Установено е, че различните багрила са основно в мономерна форма при различна концентрация: метиленово синьо – 0.0003 mg/ml; роуз бенгал – 0.05 mg/ml; порфиринови деривати – между 0.0005–0.001 mg/ml. По-ниската концентрация на веществата предполага по-малка токсичност, висока разтворимост и по-малък риск от нежелано оцветяване на зъбните структури [217]. Дезагрегация и възвръщане на багрилата към мономерна форма може да се постигне чрез добавяне на органични разтворители, детергенти или серумни протеини към водния разтвор [249].

Недостатък на фотосенсибилизаторите е и инактивирането им от светлината по време на ФАД – процес, познат като „фотоизбелване”. Той представлява светлинно зависима химична деструкция на молекулата на ФС, която води до загуба на хромофора, а оттам и загуба на способността за абсорбция на светлина и възможността за фотоактивиране на ФС. Възможност за противодействие на този феномен е последователното поставяне на ФС на няколко равни части [90].

## **6. Анализ на литературния обзор**

Значение за успешния изход при лечение на дълбок зъбен кариес имат редица фактори – правилна диагноза, точно определяне на

тежестта на патологичния процес, контрол на инфекцията – недопускане на бактериална контаминация от слюнката и максимална редукция на остатъчните МО, стриктно спазване на работния протокол. Смята се обаче, че най-важният фактор, предопределящ успеха на лечението, е липсата на микроорганизми [97, 207]. Установено е, че възстановителни материали, които се смятат за токсични, не водят до пулно възпаление и/или некроза, когато се поставят директно върху открита зъбна пулпа, ако бактериалната инфекция е елиминирана [97]. Доказано е, че оздравителен процес в ЗП настъпва само когато тя е възпалена, но не инфектирана, като при третиране на дълбоки кариозни лезии оздравителният процес включва образуване на склеротичен и третичен дентин, а в ЗП намаляват или изчезват възпалителните клетки [3, 4]. Дебелината и пропускливостта на остатъчния надпулпен дентин играе важна роля при предпазването на зъбната пулпа от увреждащи агенти, а също има отношение към въздействието на лекарствените препарати, използвани при биологичното лечение. Нивото на дифузия на агенти през дентиновите каналчета в зъбната пулпа е обратнопропорционално на дебелината на дентина и право пропорционално на напречното сечение на дентиновите каналчета, т.е. дентинът действа като частична перфузионно-дифузионна бариера. *In vivo* дентинният пермеабилитет не е константна величина – той може да се променя, напр. при кавитетна препарация.

Пълното отстраняване на кариозния дентин от дълбоки кариозни лезии в определени случаи би могло да създаде условия, компрометиращи оздравителния процес – механична експозиция на ЗП, инвазия на микроорганизмите в ЗП и др. Ето защо проблемът с отстраняването или обезвреждането на МО от кариозния дефект и подлежащите тъкани е изключително важен, като в същото време е необходимо максимално да се щади клинично здравият дентин,

включващ и деминерализиран дентин. С цел редуция на остатъчните МО в клиничната практика се прилагат различни антимикробни препарати [70]. Някои оказват дразнещо действие (евгенол, кислородна вода) и при много дълбоки кариозни лезии могат да увредят и без това засегнатата ЗП [260]. Други водят до намаляване на здравината на адхезивната връзка с КМ, което също би компрометирало оздравителния процес [141]. Част от използваните препарати не притежават достатъчно силен антибактериален ефект и не отстраняват напълно замърсяващия слой [4]. **Необходими са нови алтернативни методи за обезвреждане на остатъчните МО, които да притежават максимален антибактериален ефект и минимален цитотоксичен ефект върху клетките на ЗП.** В последните години се разработват различни методики – озонотерапия, ФДТ, лазерна кавитетна препарация и др.

Приложението на лазерна светлина – самостоятелно или в комбинация с ФС при метода на ФАД, е обещаващ алтернативен метод за антибактериално въздействие при третиране на кариозни лезии.

Резултатите от проведените изследвания в областта на ФДТ дават основание да се очаква, че ФАД ще се превърне в алтернатива на класическите методи за медикаментозно лечение на зъбния кариес. Фотодинамичният подход може да подобри, ускори и направи по-ефективно медикаментозното лечение на дълбокия зъбен кариес и биологичното лечение на реверзиблените пулпити. Предимствата на ФАД са:

1. Мощно антибактериално действие, което би редуцирало отнемането на ТЗТ при лечението на дълбоки кариозни лезии.

2. Ниска концентрация на багрилата, предполагаща ниска токсичност и безвредност за ЗП, висока разтворимост и по-малък риск от нежелано оцветяване на зъбните структури.

3. Висока селективност спрямо прицелните клетки.

4. Регулиран цитотоксичен ефект – само при облъчване със светлина с определена дължина на вълната.

**Нерешените, както и недостатъчно изяснените въпроси относно приложението на ФАД в клиничната практика, налагат допълнителни проучвания. Основни цели са синтезиране на нови ФС с намалена цитотоксичност и по-голяма ефективност на действие срещу микроорганизмите; установяване на антимикробния ефект на различни ФС (търговски продукти и новосинтезирани фталоцианинови ФС) в *in vitro* (експериментални) и *in vivo* (клинични) изследвания върху кариогенните МО; определяне на точните параметри на светлинния източник и методика на облъчване с цел постигане на оптимален лечебен ефект при намалена фототоксичност и фотоалергия.**

Прилагането на високоенергийни лазерни системи за кавитетна препарация като алтернативен метод на конвенционалното лечение придобива все по-широка популярност сред клиницистите. Използваните в клиничната практика лазери, в частност Er:YAG лазерите, притежават редица предимства пред конвенционалните наконечници – антибактериален ефект, отстраняване на замърсяващия слой от дъното и стените на кавитета, намаляване на микропросмукването, директен стимулиращ ефект върху ЗП, редукция на дискомфорта при кавитетна препарация.

**Нерешените и недостатъчно изяснените въпроси, свързани с приложението на високоенергийни лазерни системи в клиничната практика, налагат допълнителни изследвания. Основни цели са доразвиване и усъвършенстване на „кариес-селективна система”, която да отстранява само кариозната субстанция и да щади здравите ТЗТ; прецизиране на параметрите на лазерното**

**облъчване при препарация на дълбоки кариозни лезии; разработка на точни клинични протоколи, осигуряващи оптимален антими-кробен и терапевтичен ефект при минимално фототоксично и термично увреждащо действие върху ТЗТ и ЗП.**

Вземайки под внимание нерешените въпроси, правим заключение, че са оправдани усилията ни за провеждане на експериментални и клинично-лабораторни изследвания върху въздействието на ФАД и високоенергийния Er:YAG лазер при дълбоки кариозни лезии.

### III. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

#### 1. Цел

Целта 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, GaPc, 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 антимицробната активност на ФАД върху референтни бактериални щамове (*S. mutans*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *C. albicans*).

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

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

# СОБСТВЕНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ

## IV. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

### 1. Материал

Проведени са експериментални и клинико-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 фотосенсибилизатора ( $\alpha$  Gal-ZnPc,  $\beta$  Gal-ZnPc и ZnPc); галий-съдържащ

новосинтезиран фотосенсибилизатор (GaPc); комерсиален фотосенсибилизатор Фотосан (FotoSan, Agent High).

- **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).

## **Материал по задача № 1**

### **Клетъчни култури**

Сравнителното *in vitro* изследване за цитотоксичност на различни фотосенсибилизатори е проведено върху фибробластни клетъчни линии Valb/c 3T3 (clone 31). Клетъчната линия (ембрионални фибробласти от мишки), получена от Centro Substratti Cellulari, Brescia, Италия, е култивирана като монослой в  $75\text{ cm}^2$  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. За целите на научното изследване клетки от линията Valb/c 3T3 са засети в 96-ямкови плаки (Orange Scientific) в концентрация  $1 \times 10^5/\text{ml}$ . **Използвани са 21 броя плаки, от които са изследвани 504 броя ямки с клетъчни култури.**

## Фотосенсибилизатори

За целите на настоящото изследване са използвани:

1. Три Zn-съдържащи новосинтезирани фотосенсибилизатора –  $\alpha$  Gal-ZnPc,  $\beta$  Gal-ZnPc и ZnPc (означени като  $\alpha$ ,  $\beta$  и ZnPc).
2. Галий-съдържащ новосинтезиран фотосенсибилизатор (GaPc).
3. Комерсиален фотосенсибилизатор Фотосан (FotoSan, Agent High, Manufactured by CMS Dental Ap5 Ragnagade 7, 2100 Copenhagen, Denmark).

**Състав:** деминерализирана вода, глицерол, келтрол (ксантанова гума) и толуидиново синьо (активно вещество).

Новите фталоцианини са синтезирани от екип на БАН чрез модификация на познати процедури от изходно вещество 4-фталонитрил. Химикалите за синтез и спектроскопия са закупени от Sigma-Aldrich и Fluka (Germany). Получените фотосенсибилизатори са от химическата група на макромолекулните хетероциклични съединения и се характеризират с еднороден химически състав и дефинирана химична структура (доказано с мас-спектроскопия (ESIMS)). Фотосенсибилизаторите са с добра разтворимост във водни разтвори, което ги прави подходящи за приложение при фотодинамична терапия (ФДТ). Притежават силна абсорбция при голяма дължина на вълната в диапазона 600–700 nm в различни разтворители, а фотохимичните им свойства се основават на образуването на високо поколение синглетен кислород ( $^1\text{O}_2$ ) (доказан чрез Фуран-тест). Измерванията са извършени с диметилсулфоксид (DMSO) и диметилформаид (DMF). Степента на натрупване на фотосенсибилизаторите от бактериалните клетки е определена чрез флуоресценция (измерване интензивността на флуоресцентния сигнал). Отчетен е феномен на обратна зависимост на броя на сенсибилизаторните молекули спрямо клетъчната плътност.

Изходните разтвори на металфталоцианините с концентрация 1 mM са приготвени в диметилсулфоксид (DMSO) и са съхранявани на тъмно и хладно (4–7°C). Експерименталните разтвори на ФС са приготвени в стерилен 0.01 M фосфат – буфериран физиологичен разтвор (PBS) непосредствено преди всеки *in vitro* експеримент до окончателни концентрации между 1–3 μM. Оценка на концентрацията на разтвора (ФС) е извършена спектрофотометрично с апарат Shimadzu UV – Vis 3000 (Япония). Флуоресцентните спектри са записани на Perkin-Elmer LS ~ 55 апарат (UK).

#### **Източник на светлина**

Използван е светлинен източник със светлинно излъчващи диоди с дължина на вълната 635 nm, предоставен от екип на БАН. **Параметри на облъчване:** плътност на мощността 100 mW/cm<sup>2</sup> (контролирана чрез фотометър Spectra Physics, USA), светлинна доза 60 J/cm<sup>2</sup>, време на експозиция 10 min.

#### **Материал по задача № 2**

##### **Клетъчни култури**

Сравнителното *in vitro* изследване за фототоксичност на лазери с различна дължина на вълната е проведено върху фибробластни клетъчни линии Balb/c 3T3 (clone 31). Клетъчната линия (ембрионални фибробласти от мишки) е култивирана и подготвена за изследването, както в задача № 1. **Използвани са 12 броя 96-ямкови плаки (Orange Scientific), от които са изследвани 288 броя ямки с клетъчни култури.**

#### **Източник на светлина**

1. Er:YAG лазер, Fotona, AT Fidelis ( $\lambda=2940$  nm, RO2 – безконтактна ръкохватка, импулсен режим на облъчване SP (300 μs), мощност

0.40 W, 40 mJ, честота 10 Hz, без водно и въздушно охлаждане, разстояние 1 mm от целевата точка, сканираща методика).

2. Диоден лазер, ЛАХТА-МИЛОН ( $\lambda=665$  nm, мощност 500 mW, непрекъснат режим на излъчване, разстояние 1 mm от целевата точка, сканираща методика).

3. Nd:YAG лазер, Fotona, AT Fidelis ( $\lambda=1064$  nm, 200  $\mu$ m диаметър на влакното, импулсен режим на излъчване MSP (100  $\mu$ s), мощност 1.5 W, честота 15 Hz, разстояние 1 mm от целевата точка, сканираща методика).

### **Материал по задача № 3**

#### **Опитни животни**

*In vivo* изследването за цитотоксичност и фототоксичност на ФАД е проведено върху **72 бели мъжки плъха порода „Wistar”** с тегло 200–250 g. Животните са закупени от регистриран животновъден обект, хранени са с фураж за опитни животни и са настанени в плексигласови клетки с метални капаци с размер 45/35/20 cm върху постелка от талаш. Материал за хистологично изследване е взет от 144 участъка. Подготвени и микроскопски изследвани са **430 хистологични препарата.**

#### **Фотосенсибилизатори**

1. Zn-съдържащ новосинтезиран фотосенсибилизатор (ZnPc).
2. Галий-съдържащ новосинтезиран фотосенсибилизатор (GaPc).
3. Комерсиален фотосенсибилизатор Фотосан (FotoSan, Agent High).

Използваните ФС са същите, както в задача № 1.

#### **Източник на светлина**

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.

#### **Материал по задача № 4**

##### **Бактериални щамове**

За целите на изследването са използвани 4 референтни бактериални щамове:

**1. *Streptococcus mutans*** – щам 20523 – референтен щам Грам (+), микроаерофилен, кариогенен микроорганизъм от колекцията DSMZ – Германия.

**2. *Staphylococcus aureus*** – щам 1337 – метицилин резистентен щам (MRSA) от колекцията на Института по микробиология при БАН.

**3. *Enterococcus faecalis*** – щам 3915 от колекцията на Националната банка за промишлени микроорганизми и клетъчни култури – България (NBIMCC).

**4. *Candida albicans*** – щам 74 от колекцията на Националната банка за промишлени микроорганизми и клетъчни култури – България (NBIMCC).

Клетките са култивирани при 37°C при подходящи условия и хранителни среди. Преди експеримента са подготвени необходимите концентрации от бактериалните суспензии ( $\geq 10^6$  cells/ mL) във фосфат – буфериран физиологичен разтвор (PBS).

**Изследвани са посеви в 23 броя 12-ямкови плаки (270 броя ямки с размер 22 mm).**

##### **Фотосенсибилизатори**

**1. Водноразтворими, катионни металфталоцианинови комплекси (ZnPc).**

2. Водноразтворими, катионни металфталоцианинови комплекси (GaPc).

3. Фотосан (FotoSan, Agent High).

Използваните ФС са същите, както при задача № 1.

#### **Източник на светлина**

Използван е светлинен източник със светлинно излъчващи диоди с дължина на вълната 635 nm, предоставен от екип на БАН. **Параметри на облъчване:** плътност на мощността  $100 \text{ mW/cm}^2$  (контролирана чрез фотометър Spectra Physics, USA), светлинна доза 6–60  $\text{J/cm}^2$ , време на експозиция – 1, 5, 12, 20 min.

#### **Материал по задача № 5**

Изследването на температурните промени при кавитетна препарация с високоенергиен Er:YAG лазер е проведено върху **26 прясно екстрахирани, интактни човешки зъба (10 молара и 16 пре молара)**, съхранявани във физиологичен разтвор.

За кавитетната препарация е използван високоенергиен Er:YAG лазер, AT Fidelis, Fotona,  $\lambda=2940 \text{ nm}$ , безконтактна ръкохватка R02. **Параметри на работа:** използвана е програма за третиране на Caries profunda – импулсен режим на облъчване SP (300  $\mu\text{s}$ ), мощност =1.2 W, лазерна енергия = 120 mJ, честота = 10 Hz, водно охлаждане 6 степен, въздушно охлаждане 4 степен.

Отчитането на температурните промени при лазерната кавитетна препарация е осъществено посредством последна генерация инфрачервена термовизионна камера Flir A310 (FLIR Systems, Inc., 27700 SW Parkway Avenue, Wilsonville, OR 97070).

#### **Материал по задача № 6**

Сравнителното изследване на антимикробната активност на ФАД (Fotosan-Agent High), високоенергиен Er:YAG лазер и конвенционални

разтвори е проведено 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, дълбоки, акутно протичащи кариозни лезии (I и II клас), позволяващи запазване на виталитета на зъбната пулпа и прилагане на метода на индиректно пулпно покритие. Всички пациентите са без придружаващи заболявания, подписали са информирано съгласие. Взети са 85 микробиологични проби от 50 кавитета. За посяване са използвани следните хранителните среди: кръвен агар (КА) с 5% овнешка кръв, Мак Конки агар (МК), Сабуро агар (С), бульон на Тароци (Т) и елективно-селективна хранителна среда – шоколадов агар с ванкомицин за вискателни Грам (-) бактерии (США), която е разработена от колектив към Катедрата по микробиология, МУ – София.

**Изследвани са посеви в 85 броя пластмасови петрита с размер 90 mm.**

### **Препарати**

1. Фотосан (FotoSan, Agent High) – същият препарат, както в задача № 1.

2. Тубулицид – син (Tubulicid, Blue label without fluorine, Dental therapeutics).

**Състав:** Cocoamphodiacetate, Benzalkonium chloride, Disodium Edetate dihydrate, Phosphate buffer sol. pH 7.3 q.s. Aqua dest. ad 100 g.

3. Aqua destillata (Sofarma)

### **Източник на светлина**

1. Високоенергиен Er:YAG лазер, AT Fidelis, Fotona,  $\lambda=2940$  nm, безконтактна ръкохватка R02. **Параметри на работа:** Използвана е програма за третиране на Caries profunda – импулсен режим на облъчване SP (300  $\mu$ s), мощност = 1.2 W, лазерна енергия = 120 mJ,

честота = 10 Hz, водно охлаждане 6 степен, въздушно охлаждане 4 степен.

2. Светлинен източник със светлинно излъчващи диоди с дължина на вълната 635 nm. **Параметри на облъчване:** плътност на мощността 100 mW/cm<sup>2</sup> (контролирана чрез фотометър Spectra Physics, USA), светлинна доза 6 J/cm<sup>2</sup>, време на експозиция – 1 min.

## 2. Методи

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

Проведени са сравнителни изследвания за цитотоксичност на три Zn-съдържащи новосинтезирани фотосенсибилизатора, означени като  $\alpha$ ,  $\beta$  и ZnPc, галий-съдържащ новосинтезиран фотосенсибилизатор (GaPc) и комерсиален фотосенсибилизатор FotoSan (Agent High).

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) (Spielmann и кол., 1998 b) за цитотоксичност [272, 273].

За целта на настоящото изследване са използвани фибробластни клетъчни линии Balb/c 3T3 (clone 31). Клетъчната линия Balb/c 3T3 (clone 31), получена от Centro Substratti Cellulari, Brescia, Италия, е култивирана като монослой в 75 cm<sup>2</sup> 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. Културите са поддържани при 37.5°C във влажна атмосфера и 5% CO<sub>2</sub>. След рутинна трипсинизация клетки от линията Balb/c 3T3 (ембрионални фибробласти от мишка) са засети в 96-ямкови плаки (Orange Scientific) в концентрация 1x10<sup>5</sup>/ml и култивирани за 24 h. Третирането е

извършено с тест-съединенията, разредени в PBS serum-free medium, за достигане на желаните концентрации. Изпитваните вещества са прилагани в осем различни концентрации – от 10  $\mu\text{M}$  до 0.125  $\mu\text{M}$ . Клетките са инкубирани с тях в продължение на 90 min.

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

**1. Група I** – третиране с вещество  $\alpha$  (Zn-1 комплекс-  $\alpha$  Gal-ZnPc) и лазерно облъчване ( $\lambda=635$  nm,  $t=10$  min,  $60$  J/cm<sup>2</sup>).

**2. Група II** – третиране с вещество  $\beta$  (Zn-2 комплекс –  $\beta$  Gal-ZnPc) и лазерно облъчване ( $\lambda=635$  nm,  $t=10$  min,  $60$  J/cm<sup>2</sup>).

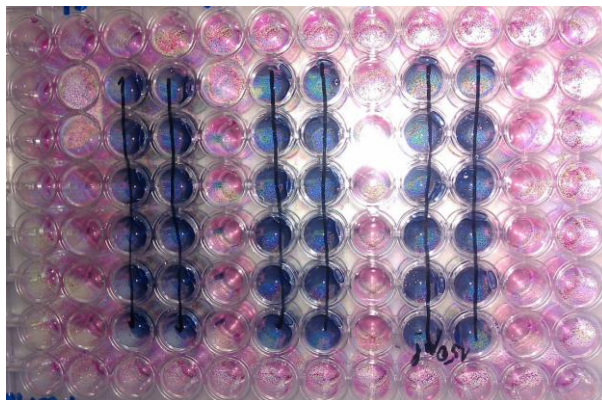
**3. Група III** – третиране с вещество ZnPc (Zn-3 комплекс) и лазерно облъчване ( $\lambda=635$  nm,  $t=10$  min,  $60$  J/cm<sup>2</sup>).

**4. Група IV** – третиране с GaPc (Ga-комплекс) и лазерно облъчване ( $\lambda=635$  nm,  $t=10$  min,  $60$  J/cm<sup>2</sup>).

**5. Група V** – третиране с FotoSan (Agent High) и лазерно облъчване ( $\lambda=635$  nm,  $t=10$  min,  $60$  J/cm<sup>2</sup>).

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

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



**Фиг. 1.** Клетъчни култури от ембрионални фибробласти от мишка

След третирането клетъчните култури са култивирани за 24 ч.

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

Статистическият анализ е извършен чрез One-way ANOVA, последван от Bonferroni's post hoc test при използване на програма GragPadPrizm 5. Резултатите са представени като mean  $\pm$  standard deviation (SD). Разликите между двете медиани са сравнени чрез непараметричен Student's test. Стойностите  $p < 0.05$  са приети като статистически значими.

## **2.2. *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**

Проведени са изследвания за фототоксичност на три клинично използвани LED източника, съответно с дължини на вълните 665, 1064 и 2940 nm.

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) (Spielmann и кол., 1998 b) за фототоксичност [272, 273].

За целта са използвани фибробластни клетъчни линии Balb/c 3T3 (clone 31). Клетъчната линия Balb/c 3T3 (clone 31), получена от Centro Substratti Cellulari, Brescia, Италия, е култивирана като монослой в 75 cm<sup>2</sup> 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. Културите са поддържани при 37.5°C във влажна атмосфера и 5% CO<sub>2</sub>. След рутинна трипсинизация клетки от

линията Valb/c 3T3 (ембрионални фибробласти от мишка) са засети в 96-ямкови плаки (Orange Scientific) в концентрация  $1 \times 10^5/\text{ml}$  и култивирани за 24 h.

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. Ямките са отделени една от друга с разтвор на „Гимза“ оцветител с цел поглъщане на разсеяното лазерно лъчение и изолация на ямките една от друга (фиг. 2).



**Фиг. 2.** Експериментална постановка

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

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

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

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

**2.1.** Индиректно лазерно облъчване през дентинов шлиф с дебелина  $1 \text{ mm}$  – облъчени са 12 ямки по  $1 \text{ min}$  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  $\mu$ 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.

След облъчване клетъчните култури са култивирани за 24 h.

Резултатите са отчетени посредством Balb/c 3T3 Neutral Red Uptake test (3T3 NRU test). След инкубиране в хранителна среда, съдържаща Neutral Red, промиване и извличане на багрилото с етанол/оцетна киселина, абсорбцията е измерена на TECAN ELISA reader при 540 nm. Всеки експеримент е проведен трикратно.

Статистическият анализ е извършен чрез One-way ANOVA, последван от Bonferroni's post hoc test при използване на програма Grag Pad Prism 5. Разликите между двете медиани са сравнени чрез непараметричен Student's test, като  $p < 0.05$  е прието за най-ниско ниво на статистическа достоверност.

### **2.3. *In vivo* изследване на биологичната 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. Животните са закупени от

регистриран животновъден обект, хранени са с фураж за опитни животни и са настанени в плексигласови клетки с метални капаци с размер 45/35/20 cm върху постелка от талаш.

Експериментът е проведен в стандартни вивариални условия, брикетна храна и вода *ad libidum*.

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,  $c=10 \mu\text{mol}$ ) ( $n=18$ ).

**2. II група** – животни, инжектирани с GaPc (новосинтезиран металфталоцианин,  $c=10 \mu\text{mol}$ ) ( $n=18$ ).

**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 0.3 ml на животно; по 0.15 ml на лява и дясна страна), като е използвана следната методика:

– Пълна анестезия със „Золетил 50” (Zoletil) – *i.m.* в доза 0.10–0.15 mg/kg живо тегло. Преди анестезията животните са назначени на 12-часова диета без вода. Период на анестетичен ефект – 30–40 min.

– Обезкосмяване на два симетрични участъка с размер 4/4 cm от двете страни на гръбначния стълб на животните.

– Маркиране с фуксин на симетрични участъци върху кожата с кръгче с диаметър 2 cm, където ще се инжектира изследваното вещество, за да подсказват мястото на находката.

– Със стерилни еднократни спринцовки са инжектирани подкожно в левия и десния подготвен участък по 0.15 ml от съответното изследвано вещество.

– 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. По време на облъчването опитните животни са фиксирани върху пластмасова подложка с цел да се избегне преохлаждане на тялото и да се осигури добро центриране на лазерния лъч. След третирането плъховете са поставени във вани с талаш и са настанени в отделна стая с 22–25°C температура до пълно излизане от анестезията.

– След изтичане на обследния 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 (табл. 1):

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.

**Табл. 1.** Разпределение на опитните животни и третираните подкожни участъци

Групи Вещества	Общ бр. животни	Подгрупи			Третирани участъци		Общ бр. третирани участъци
		1 ден	3 дни	7 дни	Ляв необлъчен	Десен облъчен	
I. ZnPc	18	6	6	6	18	18	36
II. GaPc	18	6	6	6	18	18	36
III. Фотосан	18	6	6	6	18	18	36
IV. Физ. p-p	18	6	6	6	18	18	36
<b>Общ брой</b>	72	24	24	24	72	72	144

След евтаназията са отпрепарирани кожни ламба, приблизително 1.5 до 2 пъти по-големи от маркирания размер на приложение на изследваното вещество, като кожата е отпрепарирана от подлежащите тъкани и е изрязана. Извършен е макроскопски оглед и описание на находката в третираните участъци, след което е взет материал за хистологично изследване. Всяка проба е опъната върху картон с цел да се избегне нагъване на материала при фиксацията, поставена е в индивидуален контейнер с етикет, фиксирана е в 4% неутрален формалин и е предадена за хистологично изследване (общо 144 контейнера). От направените 144 парафинови блокчета са изготвени 430 хистологични препарата по следната методика:

- а) пускане и обрязване на материалите;
- б) обработка на материалите до парафиново блокче;
- в) рязане на микротом на парафиновите блокчета;
- г) оцветяване на хистологичните препарати с хематоксилин-еозин (HE) и включване;
- д) анализ под светлинен микроскоп.

Ненужният биологичен материал и използваните инструменти за еднократна употреба са предадени за унищожаване в инсенератора ПУДДОС в Александровска болница.

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

*ЗАБЕЛЕЖКА:*

1. Изследването на биологичната поносимост на нови металфталоцианинови фотосенсибилизатори, активирани с лазерна светлина, е част от научен проект, финансиран от ФНИ – МОН, регистриран под № ДО/ 02-177 от 16.12.2008 г. (Приложение 1: Разрешение от КЕНИМУС за експериментална работа с дребни опитни животни).

2. Експериментът с плъховете е проведен в съответствие с приложение № 5 към чл. 21, ал. 1 и съгласно чл. 21 (3), (4), (6) на Наредба № 15 от 03.02.2006 г. за

минимални изисквания и хуманно отношение към опитни животни и изисквания към обектите за използването, отглеждането и/или доставката им (Обн. в ДВ, бр. 17 от 24.02.2006 г., в сила от 01.05.2006 г.) (чл. 7 и 13).

3. Опитните животни са евтаназирани чрез дислокация на гръбначния стълб в шийната област, в съответствие на Наредба № 15 от 03.02.2006 г. за минимални изисквания за защита и хуманно отношение към опитните животни.

#### **2.4. Изследване на антимикробната 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 от съответната бактериална суспензия се инкубират с 5  $\mu$ L основен разтвор на съответния металфталоцианин (1.0  $\mu$ M) (до крайна концентрация на ФС между 1–3  $\mu$ M) в продължение на 15 min на тъмно при 22°C с леко разбъркване на магнитна бъркалка и се покриват с алуминиево фолио (съхранение на тъмно). Проби от 1 mL бактериална суспензия с приблизителна концентрация  $10^6$  cells/mL са инкубирани в продължение на 15 минути на тъмно при стайна температура с равен обем Фотосан с крайна концентрация на активното вещество ТВО 88.6  $\mu$ M (1:3 крайно разреждане на Фотосан), съответно 44.3  $\mu$ M (1:6 крайно разреждане на Фотосан).

Супернатантите се отстраняват и се използват за флуоресцентни измервания с цел оценка на капацитета на поглъщане на фталоцианините спрямо изследваните микроорганизми по следната методика: клетките се промиват с фосфат – буфериран физиологичен разтвор (PBS) три пъти и след това се суспендират отново в THF: 2% воден разтвор на SDS (1:9). Екстракцията продължава 30 min, като пробите се съхраняват на тъмно. Следва центрофугиране и изследване

на събраните екстракти чрез флуоресцентен анализ. Резултатите са представени като брой оцветителни молекули за една бактериална клетка чрез обработка на получените стойности за интензитет на флуоресценцията и позовавайки се на установените калибровъчни криви.

След инкубирането равни количества от суспензията (200  $\mu$ L) са поставени в стандартна полистиренова плака за микротитруване с 96 кладенчета, където се провежда облъчването. Използвана е светлина от диоден лазер с дължина на вълната 635 nm. 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). Еднакви проби (0.1 ml) от всеки разтвор се посяват в петрита в 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  $\pm$  стандартно отклонение (SD). Значимостта на различията между средните стойности е оценена с непараметричния Student's t-test, като значими са различията при  $p < 0.05$ .

## **2.5. *In vitro* изследване на температурните промени при кавитетна подготовка с високоенергиен Er:YAG лазер**

Използвани са 26 прясно екстрахирани, интактни човешки зъба (10 молара и 16 премолара). Зъбите са почистени от органична материя с пародонтална кюрета и ултразвуков скалер и са съхранявани във физиологичен разтвор. Отстранена е кореновата част на зъбите, като срезът е направен в областта на пулпна камера, така че да се открие и запази таванът на пулпната камера. В коронарната част на зъбите са препарирани I клас кавитети с турбинен наконечник, водно-въздушно охлаждане и диамантени борери (Komet, 6835R.314.012), като един борер е използван за подготовка на 3 кавитета. Припревените кавитети 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. 3).

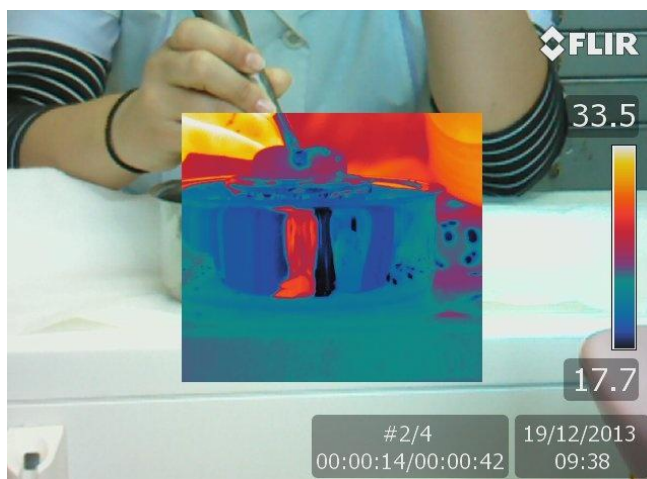


**Фиг. 3.** *Опитни образци*

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:** Използвана е програма за третиране на Caries profunda – импулсен режим на облъчване SP (300  $\mu$ 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 препарация е използвана последна генерация инфрачервена термовизионна камера Flir A310 (фиг. 4). Камерата е фиксирана статично на разстояние 1.5 m между оптичната леща на апарата и тавана на пулпната камера на образците. Термовизионните измервания са направени при постоянна температура на помещението 22°C, перпендикулярно спрямо ТЗТ. За всеки зъб са записани по 4 термовизионни измервания, през 14 sec всяко (общо време на заснемане 56 sec). Първата термовизионна снимка е направена преди започване на кавитетната препарация с цел регистриране на изходната температура на образците. Останалите 3 снимки отчитат температурните промени в хода на лазерната кавитетна препарация. За всяко измерване са регистрирани минимална, средна и максимална стойност на температурата.



**Фиг. 4.** Термовизионна регистрация на температура

Термовизионният запис и анализ на данните е извършен със софтуер ThermaCam Reporter 8.3 Pro. За статистическа обработка на данните е използвана софтуерна приложна програма SPSS 19.0. (Descriptive analysis, Variation analysis, Paired Samples Test). За

графичните изображения е използвана софтуерна приложна програма Microsoft Excel 2007.

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

Изследвана е антимикробната активност на ФАД (Fotosan-Agent High), Тубулицид и Er: YAG лазер спрямо 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 виталитета на зъбната пулпа и прилагане на метода на индиректно пулпно покритие. Пациентите са без придружаващи заболявания, подписали са информирано съгласие (Приложение 2). 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. Окончателната подготовка на пулпната и аксиалната стена на кавитета е извършена в последния етап с нови, стерилни, кръгли, стоманени борери. 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,  $\lambda=635$  nm, 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. Окончателната подготовка на пулпната и аксиалната стена на кавитета е извършена в последния етап с нови, стерилни, кръгли, стоманени борери. 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 sec (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  $\mu$ 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).

Материалът за микробиологично изследване от всички кавитети е взет със стерилни борери. 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. Изследвани са 85 микробиологични проби от 50 кавитета.

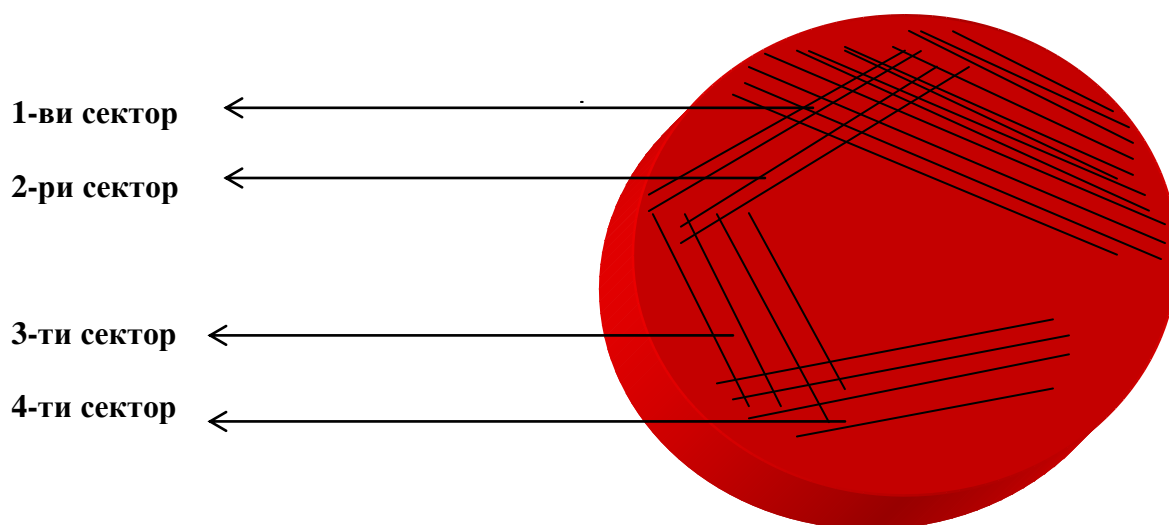
Дефинитивното възстановяване на всички кавитети е извършено едноетапно по метода на индиректно пулпно покритие (калциево-хидроксиден цимент (Dycal, DENTSPLY DeTrey GmbH), ГЙЦ (Glass-Liner, Willmann & Pein GmbH), КМ (Tetric EvoCeram, Vivadent).

За изследване на материалите от дълбоки кариозни лезии са използвани следните хранителните среди за посяване на пробите: кръвен агар (КА) с 5% овнешка кръв, Мак Конки агар (МК), Сабуро агар (С), бульон на Тароци (Т) и елективно-селективна хранителна среда – шоколадов агар с ванкомицин за вискателни Грам (-) бактерии (США), която е разработена от колектив към Катедрата по микробиология, МУ – София [10, 11, 12, 26].

Използваните среди за култивиране на материали от дълбоки кариозни лезии, както и тестовете за видова идентификация са производство на Oxoid, Becton Dickinson (BD) BBL, REMEL RAPID ID. За идентификация на видовете са прилагани понякога и среди на Клиглер, Селърс, на Хю Лайфсон, среда с фенилаланин, ампулиран желатин, бульон за нитрати, производство на Бул Био, НЦЗПБ.

След 18–24 ч. инкубация е извършван първоначален скрининг и изолиране на чиста култура. При потиснат микробен растеж култивирането е удължавано до 48<sup>-я</sup> час. Биохимичните тестове и изследване на микроскопската морфология са провеждани с 24 или 48-часова микробна култура от КА или шоколадов агар (ША). Условието за култивиране са съобразени с търсената и предполагаема етиология за постигане на оптимален резултат. Посевките на ША и на США са инкубирани задължително в присъствие на 5–10% CO<sub>2</sub> и повишена влажност, а всички останали среди – в присъствие на атмосферен O<sub>2</sub>, при 36°C в продължение на 24–48 ч.

Количественият метод е използван за посяване на материалите на посочените по-горе среди по следната схема: 1<sup>ви</sup> сектор – 30–40 щриха, следва разсявка от 1 сектор (крайната третина) на 2<sup>ри</sup> сектор – 4 щриха, от 2<sup>ри</sup> на 3<sup>ти</sup> сектор – 4 щриха и от 3<sup>ти</sup> на 4<sup>ти</sup> – също 4 щриха (фиг. 5). След култивирането са изброявани поникналите колонии в различните сектори и са сравнявани със стандартна таблица, по която е определяно микробното число в CFU/ml.



**Фиг. 5.** Количествен метод на щрихите

За статистически анализ на данните е използвана софтуерна приложна програма SPSS 19.0. Приложени са непараметричен тест на McNemar и непараметричен тест на Kruskal–Wallis.

## **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.

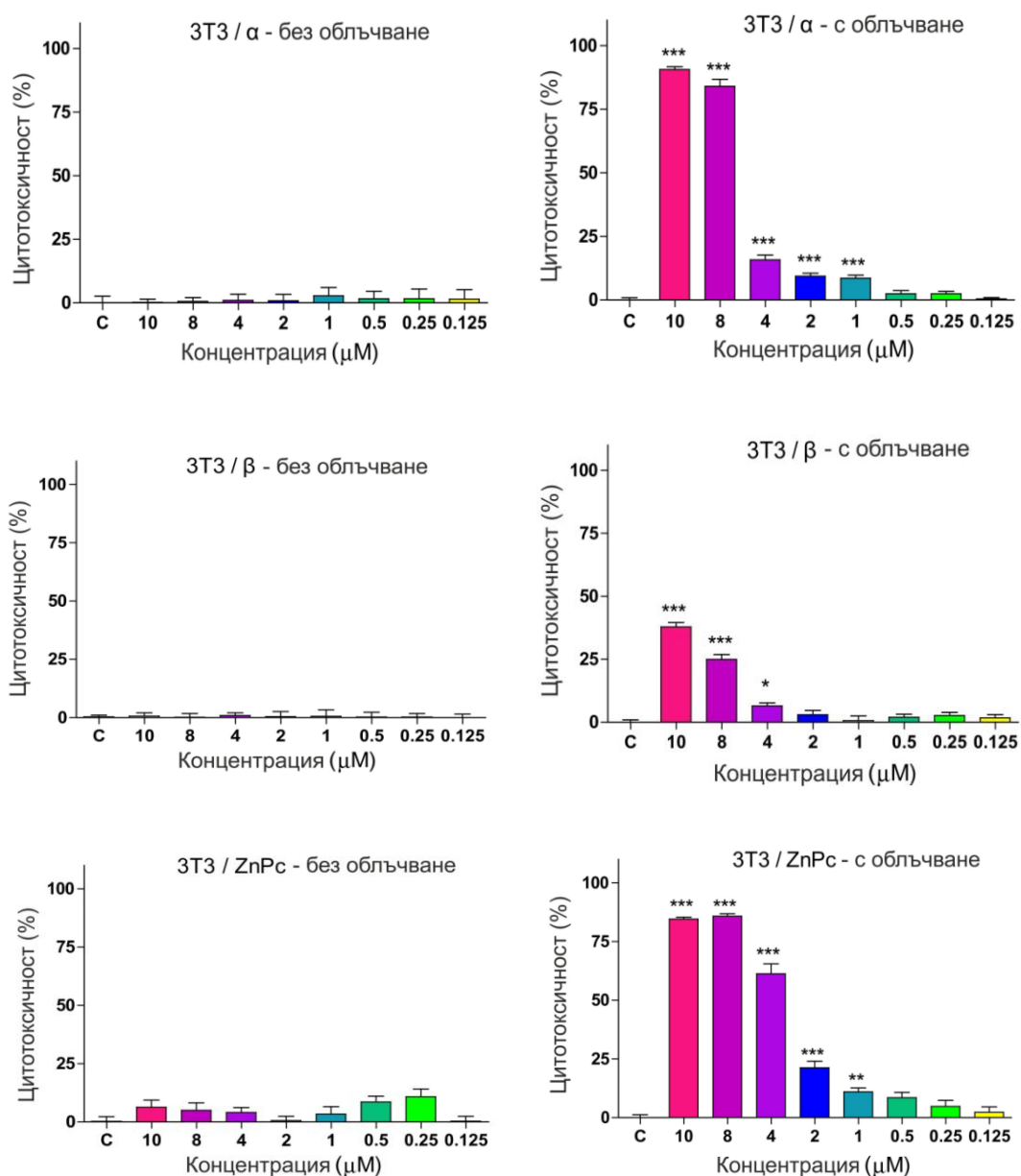
**9. Пост хок анализ на Бонферони (Bonferroni's post hoc test)** – за множествоно сравнение.

## V. РЕЗУЛТАТИ

### 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

Резултатите за цитотоксичност на Zn-съдържащи ФС са представени на фиг. 6.



Фиг. 6. Цитотоксичност и фототоксичност на Zn-съдържащи новосинтезирани фотосенсибилизатори  
C – нетретираны клетки (негативна контрола); \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001

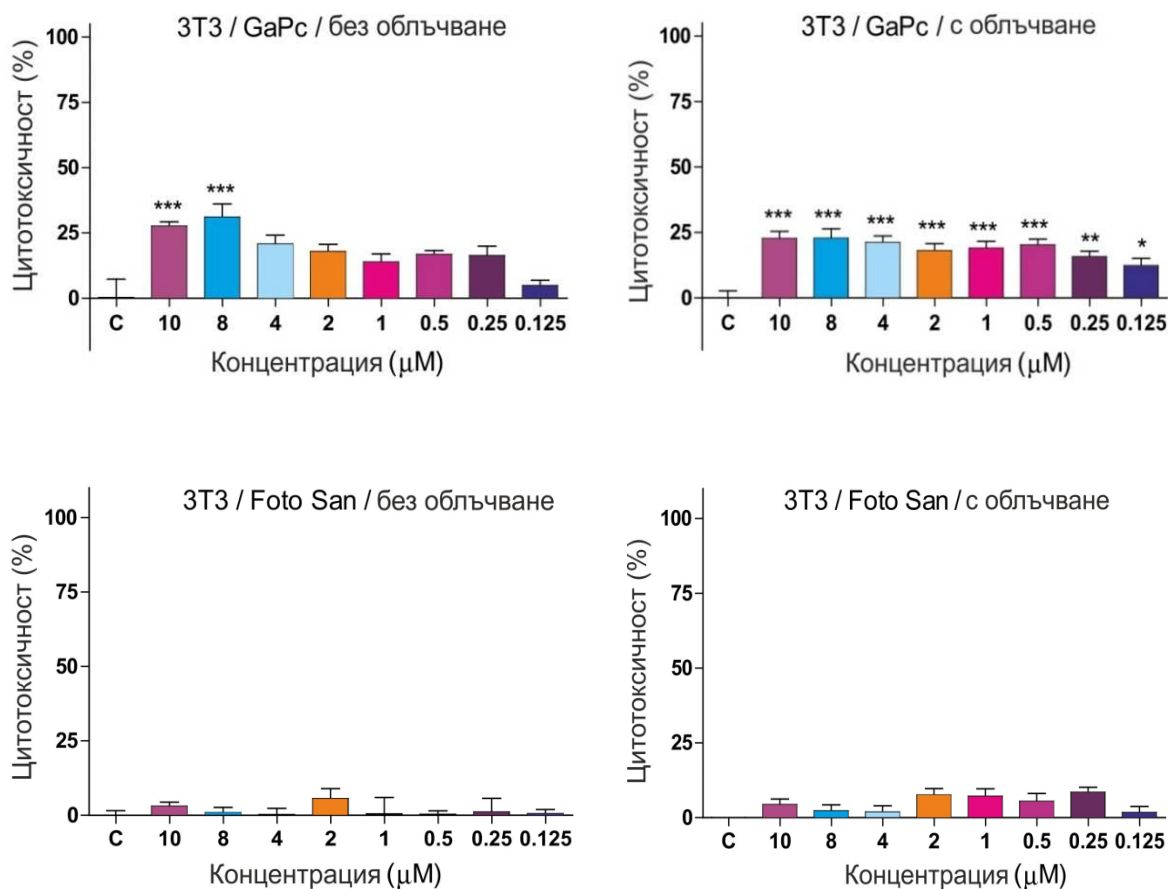
Резултатите от валидизирания Valb/c 3T3 (клон 31) Neutral Red Uptake Assay (3T3 NRU тест) показват пълно отсъствие на тъмнинна токсичност при фотосенсибилизаторите  $\alpha$  и  $\beta$  за всички приложени концентрации в границите от 0.125 до 10  $\mu\text{M}$ . При отсъствие на специфичен светлинен 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  $\alpha$  и ZnPc предизвикват статистически значима цитотоксичност при концентрации от 10 до 1  $\mu\text{M}$ . Цитотоксичност над 50% се установява при прилагане на фотосенсибилизатор  $\alpha$  в концентрации 8 и 10  $\mu\text{M}$ , а при фотосенсибилизатор ZnPc – в концентрации 4, 8 и 10  $\mu\text{M}$ . Фотосенсибилизатор  $\beta$  индуцира статистически значима цитотоксичност при концентрация от 10 до 4  $\mu\text{M}$ . При всички изследвани концентрации на ФС  $\beta$  установеният цитотоксичен ефект е под 50%.

Резултатите за цитотоксичност на GaPc и Fotosan са представени на фиг. 7.

Фотосенсибилизаторът GaPc показва статистически значима ( $p < 0.001$ ) тъмнинна цитотоксичност при концентрации 10 и 8  $\mu\text{M}$ . Установена е статистически достоверна (от  $p < 0.001$  до  $p < 0.05$ ) светлинна цитотоксичност в широки граници на концентрациите (от 10 до 0.125  $\mu\text{M}$ ) към миши ембрионални фибробласти, в сравнение с нетретираните контролни клетъчни култури. При нито една от изследваните концентрации не се установява цитотоксичност над 50%.



**Фиг. 7.** Цитотоксичност и фототоксичност на Галий-съдържащ новосинтезиран фотосенсибилизатор (GaPc) и комерсиален фотосенсибилизатор FotoSan (Agent High) С – нетретирани клетки (негативна контрола); \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$

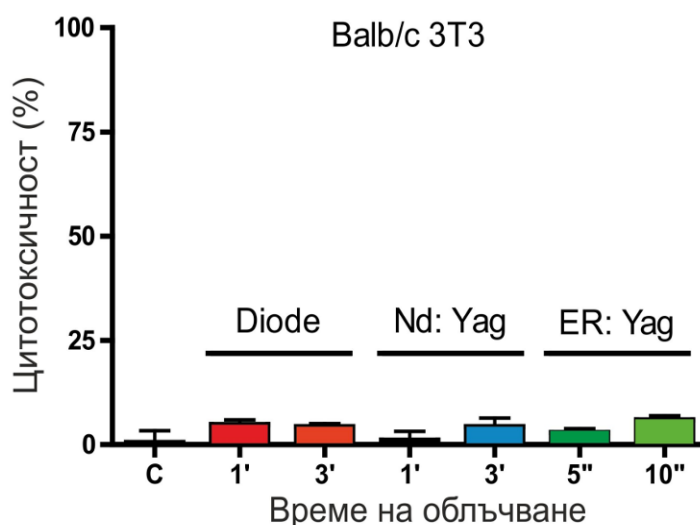
Фотосенсибилизаторът GaPc показва статистически значима ( $p < 0.001$ ) тъмнинна цитотоксичност при концентрации 10 и 8  $\mu\text{M}$ . Установена е статистически достоверна (от  $p < 0.001$  до  $p < 0.05$ ) светлинна цитотоксичност в широки граници на концентрациите (от 10 до 0.125  $\mu\text{M}$ ) към миши ембрионални фибробласти, в сравнение с нетретираните контролни клетъчни култури. При нито една от изследваните концентрации не се установява цитотоксичност над 50%.

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

## 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**

Резултатите от изследванията за цитотоксичен ефект на трите клинично използвани източника на лазерна светлина – диоден, Nd:YAG и Er:YAG лазери, са представени на фиг. 8.



**Фиг. 8.** 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.

Статистическият анализ показва, че облъчването с изследваните лазерни системи не предизвиква значим цитотоксичен

ефект върху клетъчни култури от ембрионални миши фибробласти при използваните параметри на облъчване през дентинни шлифове с дебелина 1 mm.

### **3. 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. Кожата в третираните участъци е мека, еластична, подвижна спрямо подлежащите тъкани. При отпрепарирание на кожно ламбо няма следи от приложения физиологичен разтвор (резорбиран е напълно). Тъканите и мускулите на гръдната клетка са гладки, лъскави, с непроменен цвят и тургор. Фасциите са нежни, тънки и прозрачни. Не се установяват различия между третираните и съседните участъци.

В участъците, третирани с червен лазер, не се намират отклонения от описаната картина.

## **2. Третираны животни**

### **2.1. I и II група (животни, третираны 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) не се установяват съществени различия в макроскопската находка в сравнение с предходната група. 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, третираны 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 третираны и нетретираны с лазер зони.

На 1 ден (24 час) при отпрепарирание на кожно ламбо при някои животни се установява формиране на кисти с нежни стени, изпълнени с кехлибарена течност и периферни нежни сраствания. Кистите са с овална форма, приблизително 10/12 до 15 mm, със задебелена стена, плътно прилепнали са към кожата, а понякога и

към подлежащите фасции и стената на гръдния кош до степен на твърде затруднено отпрепарирание.

На 3 ден (72 час) при отпрепарирание на кожно ламбо при по-голям брой животни в сравнение с предходната група се установява формиране на кисти с нежни стени, изпълнени с кехлибарена течност и периферни нежни сраствания. Кистите са плътно прилепнали към кожата и понякога и към подлежащите фасции и стената на гръдния кош до степен на твърде затруднено отпрепарирание. Формираните съединително-тъканни повлекла са по-груби и по-многобройни, често сраснали помежду си. Всички кисти са с овална форма, приблизително 10/12 до 15 mm, със задебелена стена.

На 7 ден при отпрепарирание на кожно ламбо при всички животни се установява формиране на кисти с характеристики, описани при предходната група (3 ден).

За хистологично изследване са предоставени всички кисти с част от съседната тъкан, в цялата дебелина на кожата.

## **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.

Описанието на микроскопската находка е представено на табл. 2.

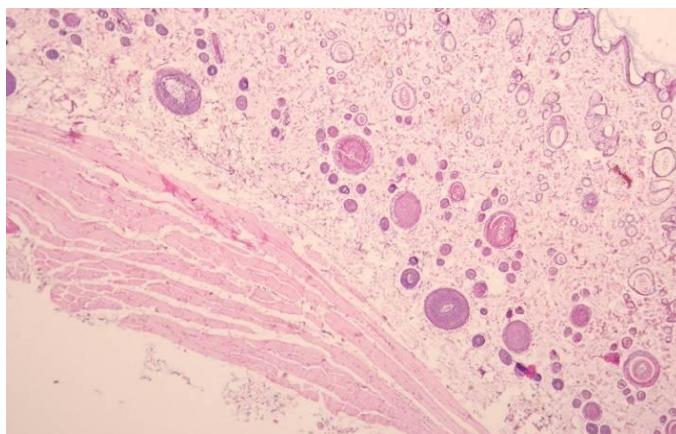
Табл. 2. Хистоморфологична микроскопска находка

Време	Подгрупи	ФС	Хистоморфологични промени			
			Хиперемия + или -	Оток + или -	Възпаление <sup>1</sup> 0 до 3	Други <sup>2</sup> 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; <sup>1</sup>Степени на възпаление: 0 – липсва; 1 – лека; 2 – умерена; 3 – тежка. <sup>2</sup>Други: К – кисти; НЛ – неутрофилни левкоцити; ЕЛ – еозинофилни левкоцити; Н – некрози; КА – калцификати.

## 1. Контролни животни

И при трите експериментални срока за наблюдение микроскопската находка не показва статистически значими патологични отклонения. Не се установяват различия между третираните и съседните нетретираны участъци (фиг. 9).



Фиг. 9. Хистологичен препарат – контролна група (оцветяване HE, увеличение x 10)

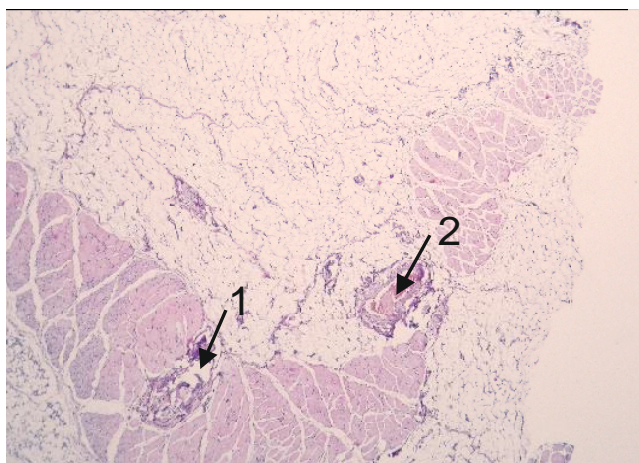
## 2. Третираны животни

### 2.1. I група (животни, третираны с ZnPc)

При всички изследвани препарати при трите времеви подгрупи микроскопски се установява хиперемия, без разлика между облъчени и необлъчени с лазер зони.

На 3 ден (72 час) се наблюдава умерен оток с излив на клетъчни елементи при облъчени и необлъчени с лазер зони. При един препарат от участък с облъчване е установено формиране на киста с нежни стени, с излив на неутрофилни левкоцити и хистиоцити в стената на кистата.

На 7 ден при персистираща хиперемия оточните промени липсват и клетъчната реакция е много по-слаба. При един от препаратите от зона без облъчване се установява наличие на неутрофилни левкоцити, а при два препарата от зона с облъчване се наблюдава излив на неутрофилни левкоцити (фиг. 10).



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

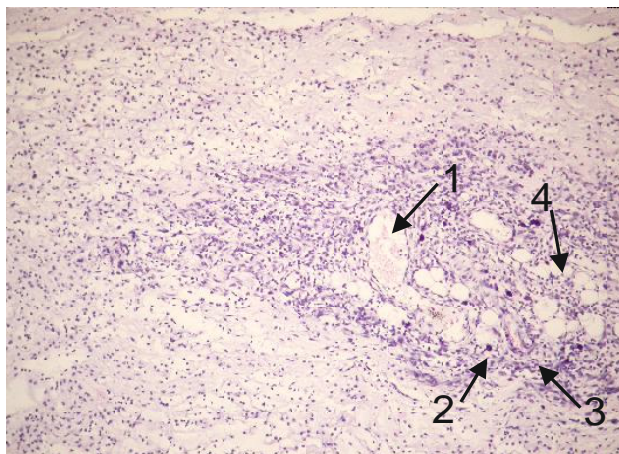
*Легенда:* 1 – Дилатиран венозен съд с кръвен застой; 2 – Артериален съд с хиперемия

## **2.2. II група (животни, третирани с GaPc)**

На 1 ден (24 час) в необлъчените зони хиперемията е минимална, съпроводена с оток, излив на клетъчни елементи и лека възпалителна реакция. Зоните с облъчване показват по-ясно изразена хиперемия и оток, по-обилен излив на клетъчни елементи и умерена възпалителна реакция. При два препарата от зона с облъчване се установява формиране на кисти с нежни стени, с излив на неутрофилни левкоцити и хистиоцити в стената на кистата. При един препарат с облъчване се наблюдава по-изразен излив на неутрофилни левкоцити.

На 3 ден (72 час) тенденцията се запазва. В необлъчените зони хиперемията е по-слабо изразена, наблюдава се по-слаб излив на клетъчни елементи и лека възпалителна реакция. В облъчените зони се установява хиперемия, по-силно изразен оток, по-обилен клетъчен излив и умерена възпалителна реакция. В един препарат се наблюдава формирана киста с нежни стени, с излив на неутрофилни левкоцити и хистиоцити в стената на кистата. При два препарата се установяват микронекротични огнища (дължат се вероятно на убождането с иглата).

На 7 ден тенденцията за хиперемия и оток се запазва, като възпалителната реакция продължава да е лека в зоните без облъчване и умерена в зоните с облъчване (фиг. 11). В един препарат от необлъчвана зона се установява микронекроза, а при един от зона с облъчване се наблюдава наличие на калцификати.

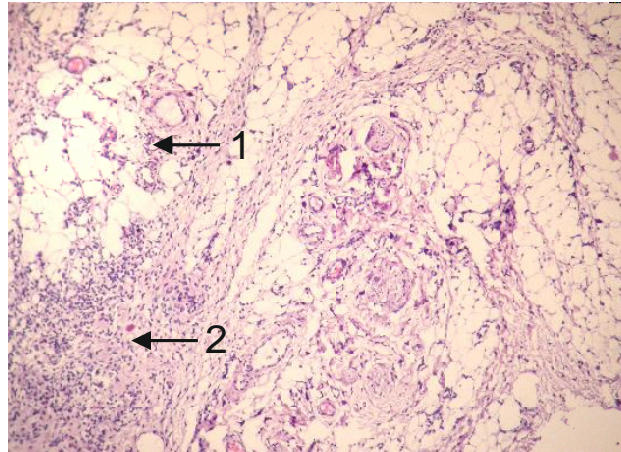


**Фиг. 11.** Зона, третирана с GaPc без облъчване, 7 ден (оцветяване HE, увеличение x 10)

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

### **2.3. III група (животни, третирани с Fotosan, Agent High)**

На 1 ден (24 час) се установява по-изразена хиперемия и оток на тъканите с излив на клетки, които в зоните на облъчване са повече (при 4 животни). Наблюдава се умерена възпалителна реакция при необлъчените зони и тежка при облъчените. При два препарата от зоните без облъчване се установява формиране на кисти, а при три – наличие на неутрофилни левкоцити. При три препарата от зоните с облъчване се откриват кисти, а в четири има излив на неутрофилни левкоцити. По-силно изразена възпалителна реакция се наблюдава при облъчените животни (фиг. 12).



**Фиг. 12.** Зона, третирана с Fotosan с облъчване, 24 час (оцветяване HE, увеличение x 10)

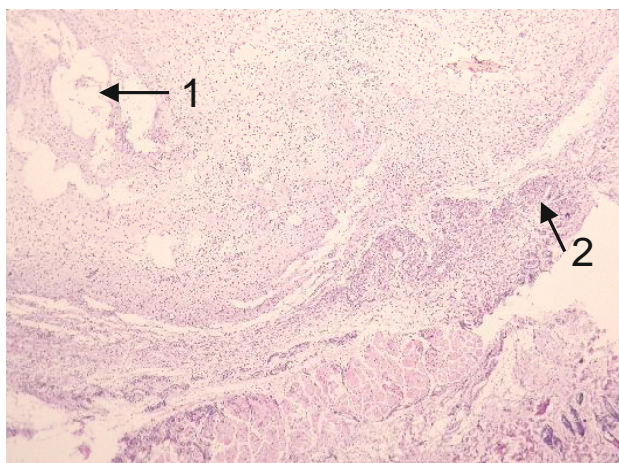
*Легенда:* 1 – Киста; 2 – Възпалителна реакция

На 3 ден (72 час) тенденцията се запазва при необлъчените и облъчени зони. В зоните с облъчване има по-тежко изразена хиперемия и оток, с по-обилен излив на неутрофилни левкоцити (при 4 препаратата). При три животни се наблюдава формиране на кисти, при един препарат се установява наличие на некротично огнище (пенетрираща некроза), а в друг препарат се открива единичен калцификат. Тези микронекрози вероятно се дължат на начина на инжектиране – по-големият вискозитет на прилаганото вещество наложи инжектирането да се извърши с игла с по-широк лумен. Наблюдава се умерена възпалителна реакция при необлъчените и тежка – при облъчените зони.

На 7 ден в необлъчените зони хистологичната картина показва по-умерена хиперемия, липса на оток и незначителен излив на клетъчни елементи. При две от животните се установяват формирани кисти.

В зоните с облъчване не се установява тенденция на отзвучаване на описаните хистологични изменения. Хиперемията е по-изразена, съпътствана с оток, наблюдава се по-обилен излив на клетъчни елементи (при 4 препаратата). При едно животно е установено наличие на еозинофилни левкоцити, а при три препаратата се откриват формирани кисти със задебелени стени и излив на левкоцити в стената на кистата.

Наблюдава се лека възпалителна реакция при необлъчените и тежка – при облъчените зони (фиг. 13).



**Фиг. 13.** 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. 3, 4 и 5.

**Табл. 3.** 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. 4.** 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. 5.** 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. 6, 7 и 8.

**Табл. 6.** 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. 7.** 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. 8.** 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. 9, 10 и 11.

В контролните групи за трите периода на наблюдение и по трите изследвани признака не се установява статистически значима разлика. При животните от контролната група на ZnPc и GaPc, не се установява

наличие на хиперемия, оток или възпаление за нито един от изследваните периоди. При животните от контролната група на Fotosan се установяват единични случаи на хиперемия, оток или възпаление с тенденция да изчезнат на 7 ден.

**Табл. 9.** 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. 10.** 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. 11.** Сравняване на ФС по признак „възпаление”, контролна група

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

#### 4. По задача № 4

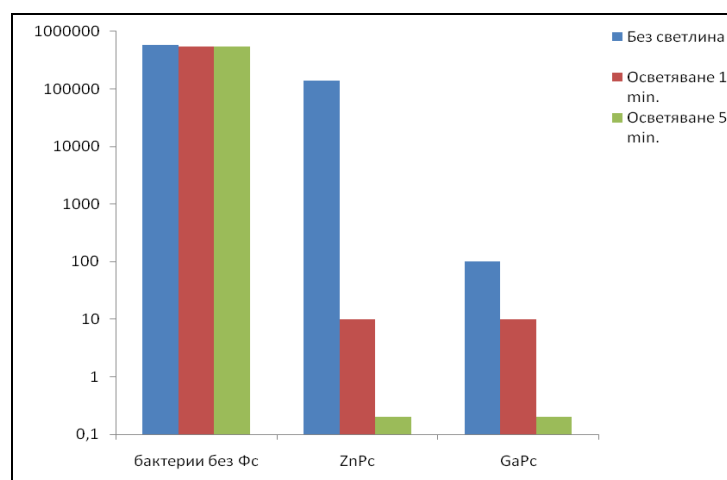
Изследване на антимикробната активност на ФАД върху референтни бактериални щамове (*S. mutans*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *C. albicans*)

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. 14.



Фиг. 14. Преживяемост на *S. mutans* при ФАД с металфталоцианини

##### – Контролни проби

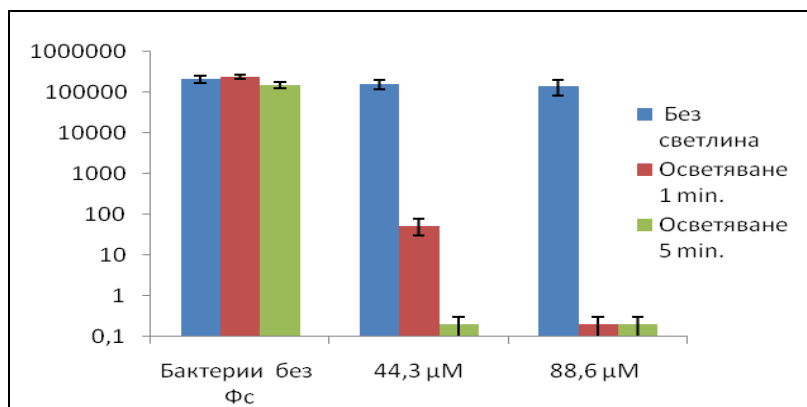
Установява се пренебрежимо ниска тъмнинна токсичност при използваните концентрации на ZnPc (<0.5 log намаление на жизнеспособните клетки). Пробите с GaPc показват висока тъмнинна токсичност при използваните концентрации (>3 log намаление на жизнеспособните клетки). Установява се пренебрежимо ниска светлинна 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 фиг. 15 и табл. 12.



Фиг. 15. Преживяемост на *S. mutans* при ФАД с FOTOSAN

Табл. 12. Ефективност на ФАД с Фотосан върху *S. mutans*

Осветяване Проби	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 μM 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 μM 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.

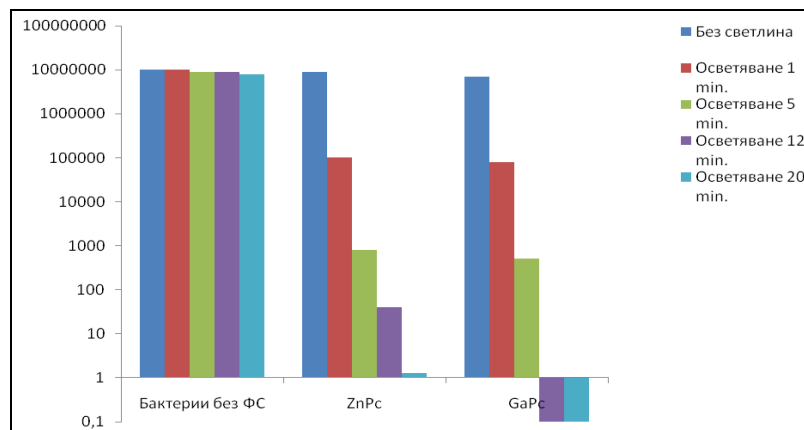
## – Проби с Фотосан (1:3) и облъчване

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. 16.



Фиг. 16. 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

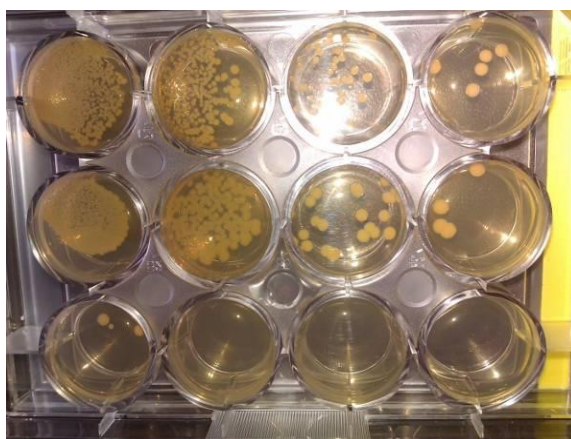
При приложение на ZnPc се установява добър фотодинамичен ефект, по-добре изразен след 5 min на облъчването. На 12 min се установява значителна редукция на жизнеспособните микроорганизми (с 6 порядъка от изходните стойности), а на 20 min живите микроорганизми са само 1.3 cfu/ml – постигнато е почти пълно 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 редукция 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) (фиг. 17)

Резултатите са представени на табл. 13 и фиг. 18.

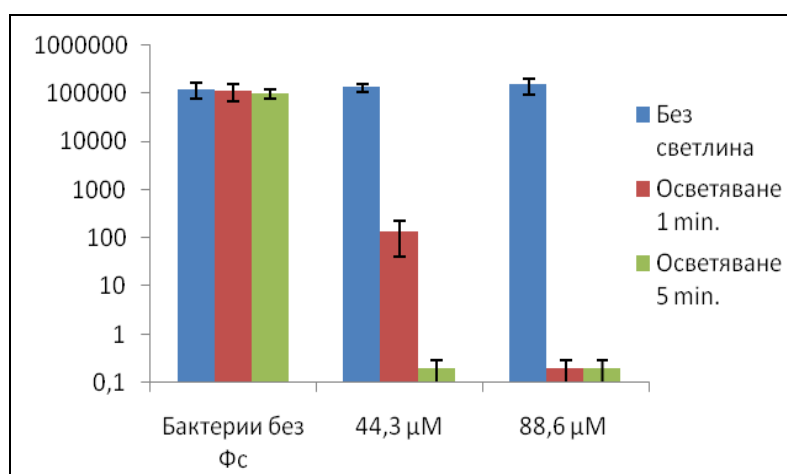


Фиг. 17. Култури от MRSA

Табл. 13. Ефективност на ФАД с Фотосан върху MRSA

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 $\mu$ 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 $\mu$ M Фотосан (1:3)	$(1.46 \pm 0.56) \times 10^5$	0 $p = 0.01^*$	0 $p = 0.01^*$

\*Статистически значима разлика



Фиг. 18. Преживяемост на MRSA при ФАД с Фотосан

### – 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.

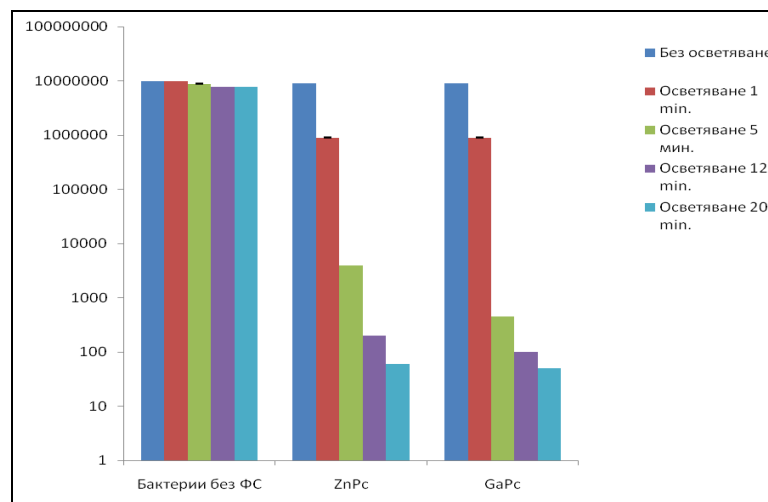
### – Проби с Фотосан (1:3) и облъчване

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. 19.



Фиг. 19. 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 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.

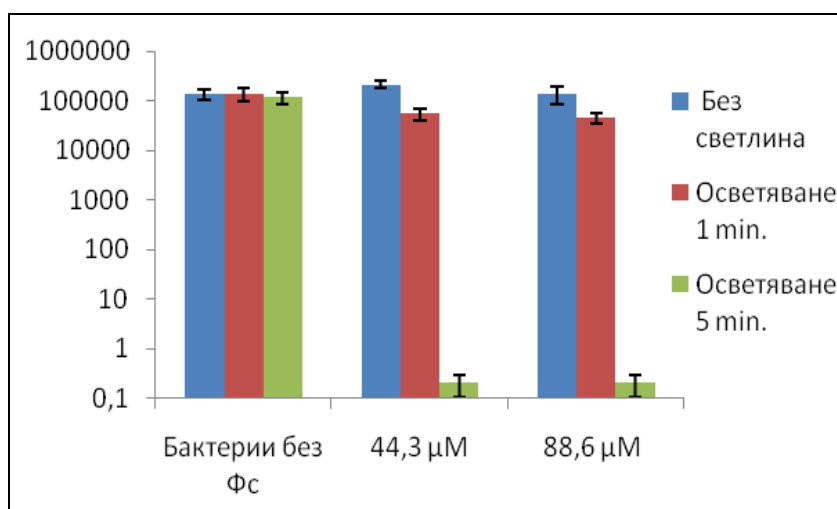
### 3.2. Фотосан (FotoSan, Agent High)

Резултатите са представени на табл. 14 и фиг. 20.

Табл. 14. Ефективност на ФАД с Фотосан върху *E. faecalis*

Проби	Осветяване	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 $\mu$ 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 $\mu$ 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



Фиг. 20. Преживяемост на *E. faecalis* при ФАД с Фотосан

### – 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

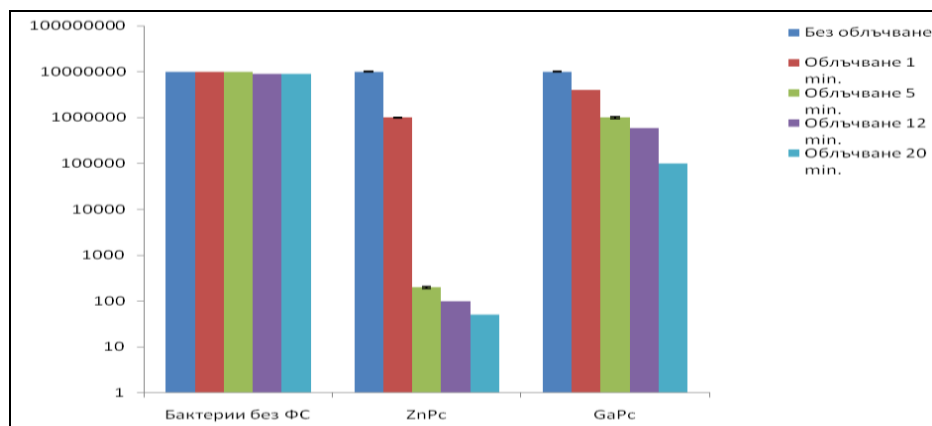
а) Облъчване 1 min – статистически значимо намаляване на живите микроорганизми от  $10^5$  до  $10^4$  (почти 1 порядък).

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. 21.



Фиг. 21. 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 ZnPc срещу *C. albicans* е значително по-силно изразен от този на GaPc. На 1 min от облъчването на суспензия от гъбички и ZnPc 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.

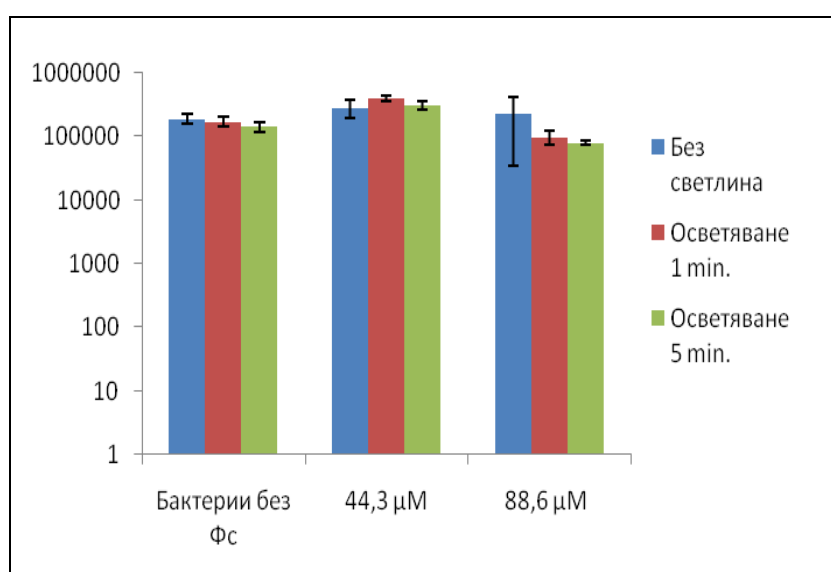
При приложение на GaPc до 12 min редукцията на живите микроорганизми е слаба – около 1 порядък от изходните стойности. На 20 min от облъчването броят на жизнеспособните микроорганизми намалява до  $10^5$  с 2 порядъка от изходните стойности.

#### 4.2. Фотосан (FotoSan, Agent High)

Резултатите са представени на табл. 15 и фиг. 22.

Табл. 15. Ефективност на ФАД с Фотосан върху *C. albicans*

Проби	Брой преживели бактерии (cfu/ml) $\bar{x}$ средно $\pm$ SD		
	Без светлина	1 минута	5 минути
<i>C. 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>C. albicans</i> + 44.3 $\mu$ M 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>C. albicans</i> + 88.6 $\mu$ M 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



Фиг. 22. Преживяемост на *C. albicans* при ФАД с Фотосан

### – 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 подготовка с високоенергиен Er:YAG лазер

Измерените минимална, средна и максимална температура на образците при кавитетна подготовка с високоенергиен Er:YAG лазер са представени на табл. 16.

Табл. 16. 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-то измерване (на 42 sec от началото на

кавитетната препазация) винаги са по-ниски от изходните (преди началото на кавитетната препазация).

В табл. 17 е представена динамиката на температурните промени по време на лазерна кавитетна препаация с Er:YAG лазер.

**Табл. 17.** Динамика на температурата по време на кавитетната препаация (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).

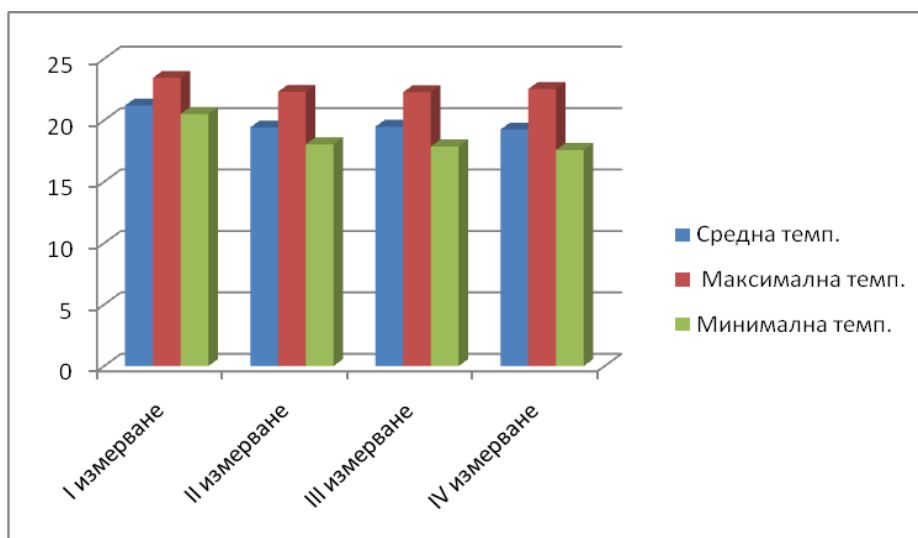
### Максимални температурни стойности

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 (фиг. 23).

### 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.



**Фиг. 23.** Динамика на температурните промени при лазерна кавитетна подготовка

Разликите между максималните и минималните температурни стойности са представени на табл. 18.

**Табл. 18.** Разпределение на температурната разлика по групи

Температура Измерване	<5.5°C	5.5-6.0°C	>6.0°C	(p)
<b>I</b>	24 (92.7%)	-	2 (7.7%)	<0.001*
<b>II</b>	20 (76.9%)	1 (3.8%)	5 (19.2%)	<0.001*
<b>III</b>	20 (76.9%)	-	6 (23.1%)	0.006*
<b>IV</b>	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 максималната и минималната температура и за четирите измервания не се установява статистически достоверно повишаване на температурата над 5.5°C.

## 6. 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. 19.

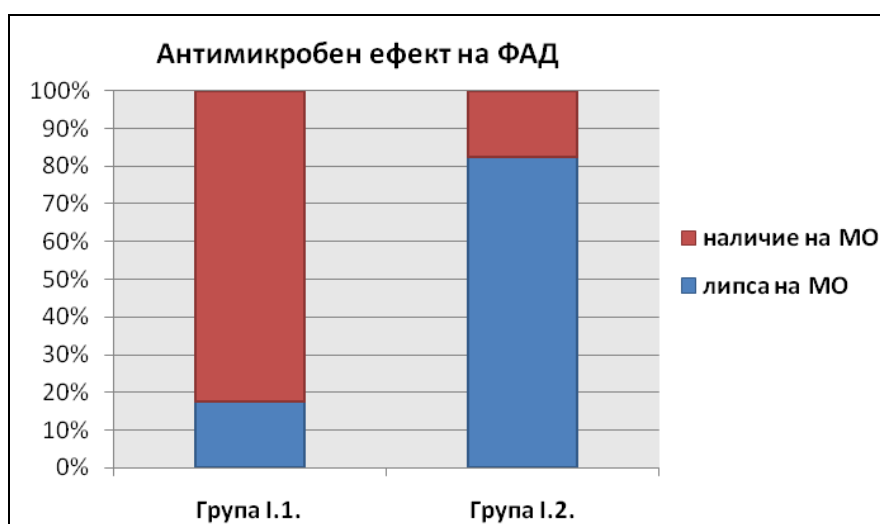
Табл. 19. Микробни изолати от дълбоки кариозни лезии, преди и след ФАД

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/m	-
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.	-	-

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 (фиг. 24).

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



**Фиг. 24.** Ефект на ФАД спрямо микроорганизми, изолирани от дълбоки кариозни лезии

Резултатите от микробиологичните проби от кавитетите преди и след третиране с Тубулицид са представени на табл. 20.

В **група II.1.** (кавитети, третирани с дестилирана вода) – от 15 проби са изолирани различни видове бактерии. Идентифицирани са 14 различни микробни вида: от тях 11 вида са Грам (+), а 3 вида – Грам (-) микроорганизми. Всички изолирани бактерии са аеробни и факултативно анаеробни. От 8 проби са изолирани по 1 вид микроорганизми, от 6 проби са идентифицирани 2 различни микробни вида, а от 1 проба са изолирани 3 различни бактериални вида.

В **група II.2.** (кавитети, третирани с Тубулицид) – се установява липса на бактериален растеж в 12 проби. От 3 проби са изолирани и идентифицирани 2 различни микробни вида, които са Грам (+), факултативно анаеробни патогени.

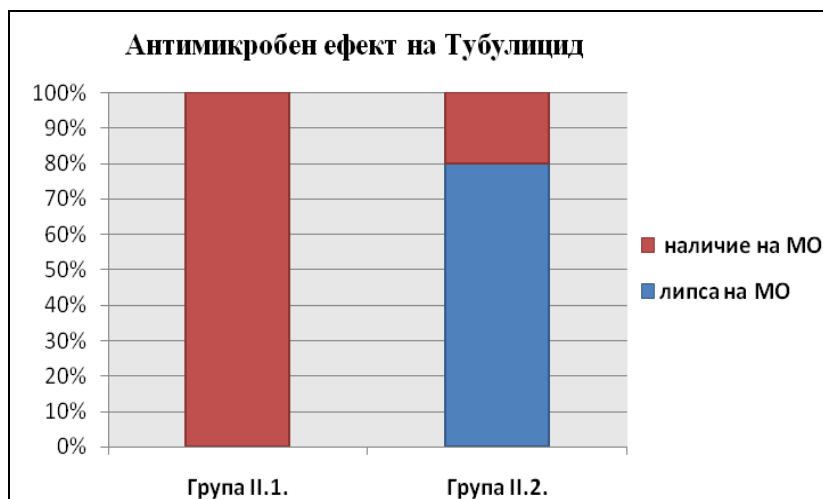
**Табл. 20.** Микробни изолати от дълбоки кариозни лезии преди и след третиране с Тубулицид

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 cloaceae</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	-

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 (фиг. 25).

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 ( $p=0.001$ ).



**Фиг. 25.** Ефект на Тубулицид спрямо микроорганизми, изолирани от дълбоки кариозни лезии

Резултатите от микробиологичните проби от кавитетите, препарирани с Er:YAG лазер, са представени на табл. 21.

**Табл. 21.** 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 constelatus</i> 10 000 cfu/ml
14.	-
15.	-

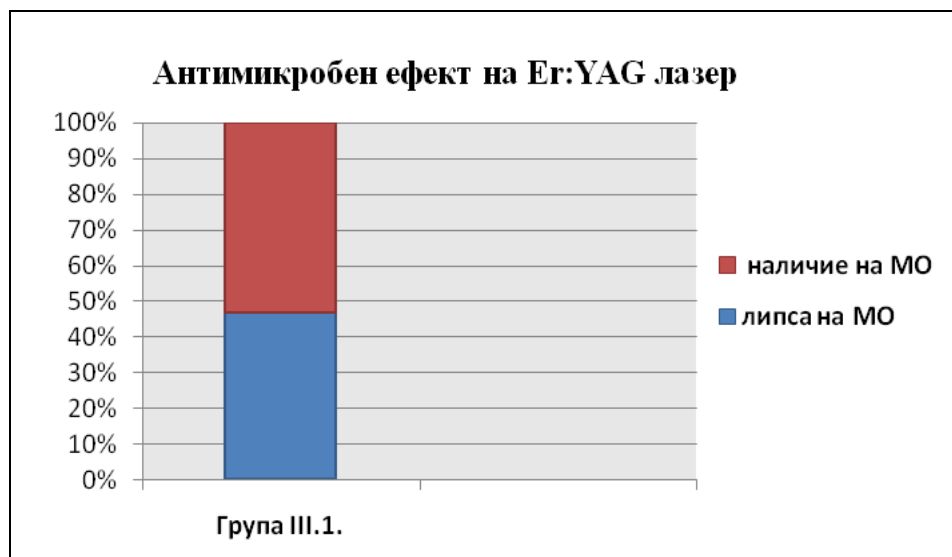
В група III.1. (кавитети, третирани с Er:YAG лазер) – се установява липса на бактериален растеж в 7 проби, а от 8 проби са

изолирани различни микробни видове. Идентифицирани са 10 различни микробни вида: от тях 9 вида са Грам (+), а 1 вид – Грам (-) микроорганизми. Всички изолирани бактерии са аеробни и факултативно анаеробни. От 6 проби са изолирани по 1 вид микроорганизми, а от 2 проби са идентифицирани 2 вида бактерии (табл. 21).

В 46.67% от случаите (7 от 15 случая) след кавитетна препарация 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 (фиг. 26).

Статистическият анализ е направен с непараметричен тест на McNemar. Резултатите показват, че след кавитетна препарация с Er: YAG лазер се установява статистически значимо намаляване на микроорганизмите ( $p=0.016$ ).



**Фиг. 26.** Ефект на Er:YAG лазер спрямо микроорганизми, изолирани от дълбоки кариозни лезии

И при трите използвани в настоящото изследване антибактериални способа (ФАД, Тубулицид, Er:YAG лазер) е

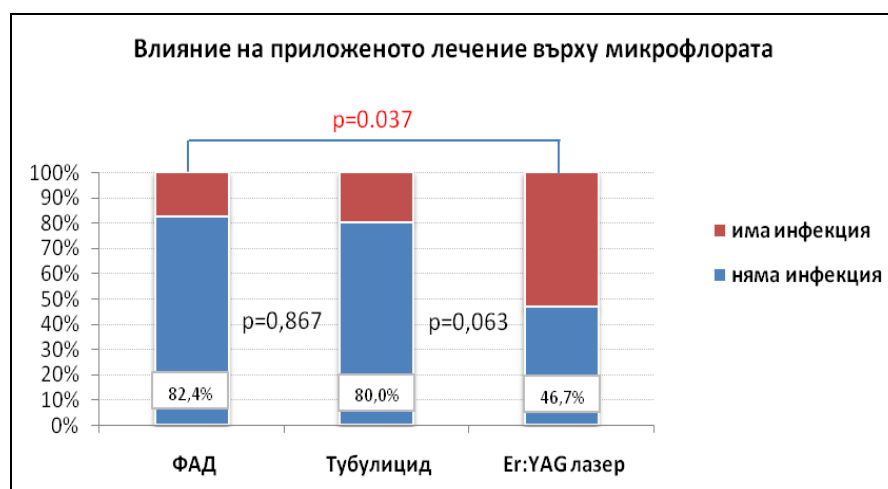
установен сигнификантно по-висок процент случаи на бактериална елиминация след третиране на кавитетите (табл.22).

Табл. 22. Сравнение на антимикробния ефект на ФАД, Тубулицид и Er:YAG лазер

Групи	Ефект след лечението	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 статистически 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. 27).



Фиг. 27. Ефект на ФАД, Тубулицид и Er: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 Er:YAG лазер.

## VI. ОБСЪЖДАНЕ

### 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 за цитотоксичност на различни видове фотосенсибилизатори са от изключително значение при оценка 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 [80]. Някои химикали, които не са токсични, могат да станат такива при излагане на светлина, което да отключи нежелан биологичен страничен ефект [201].

Използваният в изследването Valb/c 3T3 Neutral Red-тест се прилага от 2000 г. за определяне на акутна директна цитотоксичност [177, 272]. Тя се изчислява чрез спектрофотометрия, която отчита инхибирането на възможността на клетъчните култури да поемат оцветител – неутрално червено след третиране. Недостатъци на метода са използването на монослой от клетки, трудно тестване на водно-неразтворими химикали и липса на информация относно риска от фотогенотоксичност [177, 201].

**Анализът на резултатите от настоящото изследване установи незначителна или липсваща тъмнинна цитотоксичност след прилагане на Zn-съдържащи ФС в широк диапазон концентрации.** Липсата на цитотоксичност на Zn-съдържащи ФС е доказана при изследвания и на други автори – Segalla и кол. (2002), Soncin и кол. (2002) и Giuliani и кол. (2010) [201, 203, 204]. Mantareva и кол. (2011) също установяват наличие на незначителна тъмнинна цитотоксичност ( $<0.5 \log$ ) на използвания Zn-ФС [197].

След облъчване с лазер с  $\lambda=635$  nm е доказана дозозависима цитотоксична активност на Zn-съдържащите съединения  $\alpha$ ,  $\beta$  и ZnPc. Резултатите корелират с тези, получени от други изследователи – Chan и кол. (1987) и Liu и кол. (2013) [89, 182]. **Най-ниската токсична доза, при която се установява статистически значима разлика за ФС  $\alpha$  и ZnPc, е 1  $\mu$ M, докато за  $\beta$  е 4  $\mu$ M. Цитотоксичност под 50% се установява за ФС  $\alpha$  при концентрация под 4  $\mu$ M, за ZnPc – под 2  $\mu$ M, и за  $\beta$  – при всички изследвани концентрации.**

Изследваният GaPc показва наличие на тъмнинна токсичност при две от приложените концентрации (8 и 10  $\mu$ M), както и изразен цитотоксичен ефект след облъчване с лазер с  $\lambda=635$  nm при всички изследвани концентрации (от 10 до 0.125  $\mu$ M). Тези резултати са в съответствие с изследванията на Mantareva и кол. (2011) [198]. **Получените данни предполагат по-задълбочени проучвания на GaPc преди прилагане в клиничната практика.**

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.

Фотосенсибилизатор Fotosan (Agent High) показва отсъствие на тъмнинна токсичност, както и липса на статистически значима цитотоксичност след облъчване с лазер с  $\lambda=635$  nm при всички изследвани концентрации (от 10 до 0.125  $\mu$ M). Резултатите потвърждават тези, получени от Gambarini и кол. (2011) [126]. Липсата на тъмнинна токсичност при толуидиново синьо е доказана и от други изследователи – Zanin и кол. (2005), Fekrazada и кол. (2013), Necker и кол. (2013) и Nakimina и кол. (2014) [117,144,146,329]. Данните са в противоречие с изследванията на Giusti и кол. (2008), които доказват наличие на тъмнинна цитотоксичност на толуидиновото синьо, която се увеличава с увеличаване на концентрацията му [133]. **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 [46, 48, 285]. Ето защо сравнителните изследвания върху фототоксичност на различни източници на лазерна светлина спрямо клетъчни линии са от изключително значение при оценка на възможностите за тяхното клинично приложение.

За оценка на резултатите в настоящото изследване е използван Balb/c 3T3 Neutral Red-тест [177, 272]. Данните показват, че облъчването с изследваните лазерни системи ( $\lambda=665, 1064$  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 на облъчване. Резултатите от нашите изследвания за диодния лазер съвпадат с тези получени от други автори – Soukos и кол. (1996), Zanin и кол. (2005), Zanin и кол. (2006), George и кол. (2008), Giusti и кол. (2008), Guiliani и кол. (2010), Fekrazada и кол. (2013), Hecker и кол. (2013) и Nakimina и кол. (2014) [117, 128, 132, 133, 144, 146, 270, 329, 330]. Изследвания за фототоксичност на Nd:YAG и Er:YAG лазер не

бяха открити в литературата, което съвпада с обобщението при прегледа на литературните източници на Kerstein и кол. (2014) [166]. 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 [278, 283]. 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 [114]. Някои безвредни вещества могат да станат токсични при излагане на светлина, което да отключи нежелан биологичен страничен ефект [201]. Ето защо в настоящия експеримент е изследвана цитотоксичността на три различни групи ФС, приложени самостоятелно и при облъчване с лазерна светлина, както и фототоксичността на използвания светлинен източник.

Два от изследваните ФС (ZnPc и GaPc) са нови препарати, създадени за целите на научен проект, финансиран от Фонд „Научни изследвания” към МОН. Предстои сертифициране в ИАЛ, поради което

към момента не могат да бъдат прилагани в клинични условия. В настоящия експеримент се използват по-високи концентрации ( $c=10 \mu\text{mol}$ ), тъй като изследването е *in vivo*. Създават се условия за елиминиране на дразнещите субстанции и активиране на защитните сили на организма, сравнено с експеримент върху клетъчен монослой при клетъчни култури.

Макроскопското и хистоморфологичното сравнително изследване показва добра биологична поносимост на подкожната съединителна тъкан на експерименталните животни спрямо изследваните ФС (ZnPs, GaPs и Fotosan, Agent High). Тези резултати са в корелация с проведените от нас изследвания за цитотоксичност на биологични органни клетки.

При макроскопския оглед на препаратите при всички групи е установено специфично оцветяване на подкожната съединителна тъкан в зоната на апликация, идентично с цвета на изследвания материал, но с намален интензитет. В контролните групи и при трите експериментални срока за наблюдение макроскопската находка не показва патологични отклонения. При животните, третирани с ZnPs и GaPs, се установяват незначителни макроскопски промени в тъканите, без различия между третираните с лазер и нетретираните кожни полета. При всички изследвани животни, третирани с Fotosan (Agent High) за трите срока на наблюдение макроскопски и при палпация, се установява уплътняване на кожата, загуба на еластичност и подвижност спрямо подлежащите структури, наличие на кисти. Не се установяват макроскопски 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. Това**

потвърждава резултатите по задача 2, както и изследванията на други автори, които доказват, че при подходящи параметри на облъчване лазерната светлина с дължина на вълната в червения спектър не притежава фототоксичен ефект [117, 128, 132, 133, 144, 146, 270, 329, 330].

При животните, третирани с ZnPc, при всички изследвани препарати при трите времеви подгрупи микроскопски се установява хиперемия, без разлика между облъчени и необлъчени с лазер зони. Промените в тъканите са умерени до незначителни. При животните, третирани с GaPc, се установяват леки до умерени промени в тъканите, по-силно изразени в зоните с облъчване. Откриват се единични кисти, некроза и калцификати. Наличието на малко по-силно изразена реакция на GaPc, сравнен с ZnPc, съответства на резултатите, получени по задача 1.

**Въз основа на направените изследвания може да се заключи, че приложени субкутанно, новосинтезираните фотосенсибилизатори ZnPc и GaPc в изследваните концентрации не предизвикват остра тъканна реакция, както и прояви на алергична реакция.** Разликата между фототоксичност и фотоалергия е липсата на имунологични механизми при фототоксичната реакция [166]. Нашето изследване установи наличие на единични еозинофилни клетки, докато за алергична реакция е характерно изобилието от такива клетки. 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. Остър цитотоксичен ефект обаче не се наблюдава, налице е само иритативен ефект. Резултатите от нашите изследвания потвърждават данните на други изследователи,

които доказват биологичната поносимост на Zn- и Ga-съдържащи ФС [201, 197, 203].

При животните, третирани с Fotosan, микроскопските промени в тъканите са най-силно изразени. Установяват се умерена до тежка възпалителна реакция, кисти, оток, некроза и калцификати, по-силно изразени в зоните с облъчване. Наблюдава се тенденция към намаляване на интензитета на промените на 7 ден, без обаче те напълно да изчезнат. 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 толуидиновото синьо, която се увеличава с увеличаване на концентрацията му [133].

**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*)**

Поради нарастващата бактериална резистентност към антибиотици в световен мащаб е необходим 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 [173]. Освен доказан антибактериален ефект при ФАД, е установена и детоксикация и инактивиране на ендотоксини [243].

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 [324]. В настоящото проучване е изследвана антимикробната активност на три вида ФС (ZnPs, GaPs, Fotosan) спрямо четири различни бактериални щамове. Микробните видове включват *Streptococcus mutans* (основен кариогенен причинител) и MRSA, *E. faecalis*, *C. albicans* (силно устойчиви на антимикробна терапия патогени).

*Streptococcus mutans* е Грам (+), факултативно анаеробен, ацидогенен и ацидуричен патоген, образуващ биофилми [29]. Смята се за основен етиологичен фактор за развитието 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. Контролните проби показват пренебрежимо ниска тъмнинна и светлинна токсичност. Изключение прави GaPc, при който се установява нежелана тъмнинна токсичност при използваните концентрации.

Резултатите от настоящото изследване са в корелация с получените от редица автори данни. Антимикробният ефект на толуидиново синьо (фотоактивна съставка на Fotosan) е доказан в голям брой научни изследвания [85, 133, 144, 212, 226, 247, 290, 291, 11, 312, 329, 330]. При сравняване антимикробната активност на различни ФС – метиленово синьо, толуидиново синьо, еозин, еритрозин, малахитово зелено, роуз бенгал, Rolim и кол. (2012), установяват, че толуидиновото синьо е единственият ФС, който води до 99.9% редукция на *Streptococcus mutans* [247]. Paulino и кол. (2005), Giusti и кол. (2008), Fekrazada и кол. (2013) и Yin и кол. (2013) установяват, че антибактериалният ефект на ФАД спрямо *Streptococcus mutans* е дозозависим [117, 133, 234, 325]. Тези данни са в корелация с получените резултати в нашето изследване – при облъчване 1 min подобър ефект показва по-високата приложена концентрация на Fotosan (1:3). Настоящият експеримент потвърди и данните, представени от Wood и кол. (1999) относно много добрия антибактериален ефект на фталоцианинови ФС спрямо *Streptococcus mutans* [319]. **Нашите резултати 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 [179].**

*Staphylococcus aureus* е Грам (+), факултативно анаеробен, силно патогенен МО [29]. 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 (с 6 порядъка).

Резултатите от настоящото изследване потвърждават изследванията на други автори. Wilson и кол. (1995, 1999), Tang и кол. (2007), Najim и кол. (2010), Kashef и кол. (2012) и Yin и кол. (2013) установяват много добър антибактериален ефект спрямо MRSA при ФДТ с толуидиново синьо [143, 162, 280, 316, 317, 325]. Mantareva и кол. (2011), Yin и кол. (2013) и Георгиева (2015) също доказват добра антибактериална активност при използване на фталоцианинови ФС (Zn- и Ga-съдържащи ФС) [10, 198, 325]. Установена е значителна редукция на MRSA – от 4–5 порядъка до пълно унищожаване, в зависимост от концентрацията на ФС и времето на облъчване. При сравнение на Zn- и Ga-съдържащи ФС е доказана незначителна разлика в антимикуробния им ефект в полза на Ga-съдържащия ФС. Тези данни се потвърдиха и в резултатите от нашите изследвания. Аналогичен на доказанието от нас антибактериален ефект при прилагане на Zn-съдържащи ФС е установен и от Segalla и кол. (2002) и Soncin и кол. (2002) [256, 267]. Други автори обаче установяват по-добра от

получената в настоящето изследване антимикуробна активност на Zn-съдържащи ФС спрямо MRSA [89, 132, 197].

**Резултатите от нашия експеримент, както и тези от подобни изследвания, доказват, че ФАД може да бъде ефективна и спрямо резистентни на антибиотици МО.**

*Enterococcus faecalis* е Грам (+), факултативно анаеробен, силно устойчив на антимикуробна терапия патоген [27]. 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  $\mu\text{m}$  [37, 65, 183, 276, 296]. 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 антимикуробен ефект на ФДТ с толуидиново синьо спрямо *E. faecalis*, доказан от други автори [205, 298]. Necker и кол. (2013) обаче установяват по-слабо изразена антимикуробна активност при облъчване 4–6 min, което противоречи на нашите резултати за максимален фотодинамичен ефект [146]. Проведени сравнителни изследвания върху антибактериалния ефект на ФДТ и NaOCl срещу *E. faecalis* също показват противоречиви резултати. Rogio и кол. (2011) и Vaziri и кол. (2012) установяват по-добър ефект на ФДТ, сравнено с NaOCl [239,

296]. Yildirim и кол. (2013) и Xhevdet и кол. (2014) смятат, че антибактериалната им активност е еднаква [320, 324]. Meire и кол. (2009), Roggio и кол. (2011) и Yao и кол. (2012) доказват по-слаб ефект на ФДТ, сравнен с NaOCl [205, 239, 323]. При прилагане на фталоцианини (Zn-и Ga-съдържащи ФС) Георгиева и Mantareva и кол. установяват значително намаляване до пълна редукция на *E. faecalis* в зависимост от използваните концентрации и параметри на облъчване [10, 198]. **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.** Умерено изразен антиминобен ефект спрямо *E. faecalis* е установен и при прилагане на други видове ФС (метиленово синьо, индоцианиново зелено, ТНРС и др.) [119, 175, 210, 218, 230, 320]. **Знае се, че тези МО произвеждат собствени реактивни кислородни радикали [57], което може да обясни ограничения ефект на ФАД спрямо тях.**

*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 [137]. 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 [37, 187]. 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 [211, 223]. 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 ZnPc за 5, 12, 20 min.**

При прилагане на толуидиново синьо Gonzales и кол. (2012) и Yin и кол. (2013) установяват редукция от 3–5 порядъка до пълно унищожаване на *C. albicans* [137, 325]. Тези резултати са в противоречие с данните, получени в нашето изследване. Други автори доказват слаб антимикробен ефект на ФДТ с толуидиново синьо [101, 102, 131, 314]. Те посочват метиленовото синьо като по-ефективен ФС спрямо *C. albicans*. Изследвания върху антибактериалното действие на фталоцианини (Zn- и Ga-съдържащи ФС) при ФДТ показват намаляване с 3–10 порядъка до пълно унищожаване на третираните МО [132, 176, 198]. Резултатите противоречат на получените в настоящото изследване. 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  $\mu\text{M}$ ) и голяма плътност на мощността (100  $\text{mW}/\text{cm}^2$ ) [106, 197]. Използваните параметри в нашето изследване са значително по-ниски, 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 and Hamblin (2005). Смята се, че причината се дължи на ядрената мембрана и големия размер на клетката [106, 202]. Donnelly и кол. (2007) и Dai и кол. (2012) установяват при сравнително изследване на ФДТ спрямо бактерии и гъбички, че при антигъбичната ФДТ са необходими по-високи концентрации на ФС (над 1  $\mu\text{M}$ ), а при *in vivo* антигъбична терапия тези концентрации трябва да бъдат още по-високи [101, 110].

**При контролните проби бактериални суспензии *S. mutans*, MRSA, *E. faecalis* и *C. albicans* се установява пренебрежимо ниска тъмнинна и светлинна токсичност. Изключение прави GaPc, при който се установява нежелана тъмнинна токсичност при използваните концентрации в пробите със *S. mutans*. Резултатите от това изследване потвърждават данните, получени от нас в задача 1 и 2. Резултатите са в корелация и с предклиничните изследвания, които доказват, че ФС са по-токсични към МО в сравнение с клетките на бозайници, тъй като светлинно индуцираната токсичност се осъществява много по-рано за прокариотни, отколкото за еукариотни клетки.**

**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 [128, 173]. Установена е обратно пропорционална зависимост между акумулирането на фотосенсибилизаторите и гъстотата на микробните суспензии, независимо от произхода на МО и вида на ФС [198]. С цел стандартизиране на експерименталните условия, всички използвани клетъчни суспензии в нашето изследване са с еднаква плътност.**

Редица изследвания доказват, че катионните комплекси имат подобър антибактериален ефект от анионните и неутралните, особено спрямо устойчивите Грам (-) МО [90, 197, 217]. Използваните в нашето изследване новосинтезирани металфталоцианинови ФС (ZnPc и GaPc) са катионни, водноразтворими съединения. Доказано е, че химичната структура на фталоцианините може да бъде променена чрез въвеждане

на заместители в периферна позиция, напр. метални йони, което да промени фотофизичните им качества [256]. Rosental и кол. (1991) и Mantareva и кол. (2011) установяват, че заместването на Zn с Ga в ядрото на лиганда води до повишено образуване на синглетен кислород [198, 249]. Тези резултати се потвърдиха и при настоящото изследване, като GaPc показва по-добра антибактериална ефективност спрямо изследваните МО, с изключение на *S. albicans*. **Нашите проучвания показват, че новосинтезираните металфталоцианинови комплекси са обещаващи фотодинамични сенсibiliзатори 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 антимикуробен ефект е постигнат при *S. mutans* – пълно унищожаване на живите МО на 5 min.**

**Най-бърз и значим антимикуробен ефект спрямо всички изследвани микроорганизми е установен в нашето изследване при приложението на Fotosan.** Изключение правят пробите с *S. 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 антимикуробна активност в реални условия. Установеният от нас добър антибактериален ефект на толуидиновото синьо е потвърден в редица изследвания [157, 162, 228, 303]. Kashef и кол. (2012) доказват, че той е по-ефективен от другото фенотиазиново багрило – метиленово синьо [162]. Tegos и кол. (2006) установяват, че багрилото е идентично във физикохимично отношение с алкалоид, който е субстрат на ефлукс-системата на Грам (+) МО [281]. По-слабо изразеният антибактериален ефект на

новосинтезираните металфталоцианини може да бъде обяснен с по-ниската концентрация на използваните разтвори (1–3  $\mu\text{M}$ ) 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 светлинната 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. **Предложеният метод на третиране може да бъде обещаващ алтернативен метод за лечение на денталните инфекции на приемлива цена.**

## **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 [139, 181]. Научни изследвания доказват, че дентин с дебелина

0.5–1 mm е лимит за защита на зъбната пулпа [244]. Други автори посочват необходимост от 2 mm дебелина на остатъчния надпулпен дентин, за да бъде ЗП адекватно защитена от потенциално травматични оперативни процедури [93]. Настоящото изследване е проведено през дентин с дебелина 1.5 mm, тъй като при лазерна кавитетна препарация се отнема допълнително количество ТЗТ и в рамките на 56–60 sec остатъчната дебелина е около 1 mm. И в двата случая дебелината на остатъчния надпулпен дентин отговаря на дълбока кариозна лезия в клинични условия.

Повишаването на температурата може да доведе до постоперативна чувствителност, изгаряне на тъканите, пулпна некроза, образуване на репаративен дентин [167]. Увреждането на тъканите зависи от достигнатите температурни стойности и продължителността на въздействие [93]. 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 [328].

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. Данните от нашите резултати потвърждават тези, получени от други автори – Gouw-Soares и кол. (2001), Fried и кол. (2002), Al-Batayneh и кол. (2014) и др. [56, 60, 66, 98, 111, 123, 139, 164, 235, 268, 279, 326].

Приема се, че Er:YAG лазерът е по-малко инвазивен в сравнение с други високоенергийни лазерни системи. Неговата дължина на вълната се абсорбира селективно от водата в ТЗТ и аблацията започва при температурни стойности под точката на топене на биологичните апатити [93, 248, 263]. Ограниченото повишаване на температурата в прилежащите тъкани се обяснява с факта, че доставената енергия се

елиминира в по-голямата си част от водната пара, а скоростта на аблация е такава, че много малко количество топлина има възможност да се транспортира към околните тъкани [8, 84]. **Научни изследвания доказват, че повишаването на температурата при кавитетна препарация с лазер е сравнимо с това при използване на конвенционален наконечник и работа с диамантен борер [87, 93, 167, 231, 264].**

В литературата съществуват и данни за повишаване на температурата при лазерна кавитетна препарация над критичните за ЗП  $5.5^{\circ}\text{C}$  [129, 134, 220, 229]. Тези изследвания противоречат 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 намаляване на термичния ефект при лазерна кавитетна препарация се прилагат различни прийоми – работа под водно-въздушно охлаждане, сканираща методика на облъчване, отстояние на ръкохватката от ТЗТ и др. Честотата на пулса също има значение за генерирането на топлина – по-къс пулс води до по-малко повишаване на температурата [139, 149].

Резултатите от настоящото изследване показват, 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 ( $SP=300\ \mu\text{s}$ ), както и подходящо за избраните параметри на облъчване водно-въздушно охлаждане. Научни изследвания доказват редукция между 10 и 50% от температурата на облъчване при използване на воден спрей [125, 236]. Ако количеството

му не е достатъчно, се установява повишаване на температурата с до 24.7°C, зони на разтопяване и напукване на ТЗТ, овъгляване на дентина, наличие на кристализиран дебрис по стените на препарацията, липса на аблация.

Важно е да се отбележи, че при *in vitro* експериментите липсва кръвна циркулация и водното съдържание на ТЗТ е по-ниско, което при *in vivo* условия би осигурило разсейване на топлината и допълнително охлаждане [115]. Очакваните температурни промени при лазерна кавитетна препарация на витални зъби при същите параметри на облъчване биха били по-слабо изразени.

За отчитане на температурните промени при работа с лазер се използват различни техники – термодвойки (К-тип), термокамера, Микро-Раман спектроскопия, фотолуминесценция и др. [237, 262]. Методиката, избрана в настоящото изследване – **термовизионна диагностика**, е модерен метод в съвременната медицина, позволяващ неинвазивно отчитане на температурни промени чрез регистрация на инфрачервената емисия от изследваните повърхности [55, 74, 112]. Viagioni и кол. за първи път прилагат инфрачервена камера в денталната медицина през 1996 г. [75]. Методиката притежава неоспорими предимства пред регистрацията на температурните промени с термодвойки: софтуерът позволява запис на данни и сравнение между различни точки на измерване, дава възможност за измерване и анализ на данните в реално време, позволява отчитане на температурата в по-широка област, осигурява цветни двуизмерни изображения и възможност за няколко измервания в секунда, без необходимост от адаптационен период [152]. Всички измервания в нашето изследване са направени в стая с контролиран климат и при стандартизирани условия (отстояние на инфрачервената камера от образците, технически настройки на камерата и лазера, интервали на

температурно отчитане), което осигурява възможност за оптимално отчитане на термичните промени от максимално голяма повърхност на образците.

**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 отстраняването на кариозната маса и obtурирането на кавитета е доказано наличие на остатъчни микроорганизми под obtурациите. Част от запечатаните микроорганизми не оцеляват, но други продължават своето развитие, понякога повече от година след obtурацията [260]. Виталните бактерии биха могли да инициират развитието на нова кариозна лезия и/или да причинят увреждане на ЗП през дентиновите каналчета, особено при тънък надпулпен дентин при дълбоки кариозни лезии [81]. С цел отстраняване на остатъчните МО се използват различни антимикробни препарати, както и алтернативни антибактериални методи.

В търсене на максимално ефективен антибактериален способ в настоящия експеримент сме изследвали антимикробната активност на ФАД (Фотосан), Er:YAG лазер и Тубулицид. 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 потиска 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 [11, 12, 13, 28].

### **I. Кавитети, третирани с ФАД**

Антимикробният ефект на ФАД е доказан от редица изследователи. Като локализирана инфекция, зъбният кариес би могъл да се повлияе добре от ФАД, като ФС се поставя в лезията със спринцовка, а светлината се насочва чрез оптично влакно [312]. Използваният в нашето изследване препарат Fotosan съдържа активно вещество толуидиново синьо – фенотиазиново багрило с изразен антимикробен ефект [133, 162, 303].

В група **I.1.** (дестилирана вода) – са изолирани различни микробни видове в 85% от пробите. Идентифицирани са 14 различни микробни вида – *Streptococcus* (5), *Staphylococcus* (1), *Actinomyces* (1), *Enterococcus* (1), *Corynebacterium* (1), *Enterobacter* (1), *Haemophilus* (1), *Neisseria* (2), *Bacillus* (1). Грам (+) микроорганизми са повече от Грам (-).

В група **I.2.** (ФАД) – са изолирани микробни видове от 15% от пробите. Идентифицирани са 4 различни микробни вида - *Streptococcus* (2), *Enterobacter* (1), *Bacillus* (1). Грам (+) микроорганизми превалират спрямо Грам (-).

И в двете групи изолираните бактерии са основно аеробни и факултативно анаеробни Грам (+) микроорганизми. В група I.2. е установено по-ниско микробно число и по-малко разнообразие на микробните видове. В 82.35% от случаите след прилагане на ФАД 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 редица изследователи антибактериален ефект на толуидиновото синьо. Zanin и кол. (2005), Giusti и кол. (2008), Vahabi и кол. (2011) и др. установяват много добра, дозозависима редукция на *S. mutans* [85, 117, 133, 144, 212, 226, 247, 290, 291, 311, 312, 325, 329, 330]. Значително намаляване на микробното число е установено от Wilson и кол. (1999), Tang и кол. (2007), Hajim и кол. (2010), Kashef и кол. (2012) и Yin и кол. (2013) при третиране на MRSA с различни концентрации на толуидиново синьо [143, 162, 280, 317, 325]. Gonzales и кол. (2012) и Yin и кол. (2013) доказват добър антибактериален ефект срещу *C. albicans* [137, 325]. Други автори установяват, че антимикуробният ефект на толуидиновото синьо спрямо *C. albicans* е по-слаб от този на метиленовото синьо [101, 102, 131]. Противоречиви са данните и относно антибактериалния ефект на толуидиново синьо срещу *E. faecalis*. Meire и кол. (2009), Roggio и кол. (2011) и Vaziri и кол. (2012) установяват значителна редукция на микробното число [205, 239, 296]. Според Meire и кол. (2009), Yao и кол. (2012), Meire и кол. (2012) и Necker и кол. (2013) антибактериалният ефект на ФДТ с толуидиново синьо спрямо *E. faecalis* е слабо изразен [146, 204, 205, 323]. 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 [324]. **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 [179].**

## 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 [286]. По литературни данни разтворът не повлиява здравината на връзката с КМ, биологично поносим е и може да бъде използван като кавитетен дезинфектант [71, 260, 284, 286].

В група II.1. (дестилирана вода) – са изолирани микробни видове от всички проби (100%). Идентифицирани са 13 различни микробни вида – *Streptococcus* (5), *Staphylococcus* (1), *Enterococcus* (1), *Lactobacillus* (1), *Actinomyces* (2), *Enterobacter* (1), *Kingella* (1), *Bacillus* (1). Грам (+) микроорганизми са повече от Грам (-).

В група II.2. (Тубулицид) – са изолирани микробни видове от 20% от пробите. Идентифицирани са 2 микробни вида – *Staphylococcus aureus* и *Sreptococcus mitis*, Грам (+), факултативно анаеробни микроорганизми.

И в двете групи изолираните бактерии са основно аеробни и факултативно анаеробни Грам (+) микроорганизми. В група II.2. е установено по-ниско микробно число и по-малко разнообразие на микробните видове. В 80% от случаите след прилагане на Тубулицид 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 *Sreptococcus mitis* се наблюдава от 10 до 10 000 пъти намаляване на броя на живите микроорганизми.

Ефектът на EDTA е доказан отдавна [70, 82, 83]. 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) [260, 284]. Те установяват много добър антибактериален ефект на Тубулицид, но не 100% унищожаване на остатъчните МО.** При изследването 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 [215].

### **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 [322]. **Едно от важните предимства на Er:YAG-лазерът е, че за да е ефективен, не е необходимо да бъде в плътен контакт с прицелната тъкан за разлика от химичните дезинфектанти [204, 205,224].**

В група III.1. (Er:YAG) – са изолирани различни микробни видове от 53.33% от пробите. Идентифицирани са 10 различни микробни вида – *Streptococcus* (5), *Staphylococcus* (2), *Corynebacterium* (1), *Enterococcus* (1), *Enterobacter* (1), основно аеробни и факултативно анаеробни МО. В тази, както и в предходните изследвани групи, от кариозните лезии е изолирана полимикробна флора [25]. Установен е най-висок относителен дял на Грам (+) МО, което потвърждава факта, че повечето киселинно-образуващи МО са Грам (+) [170].

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) доказват много добър антимикробен ефект при лазерна кавитетна препарация [151]. Редица автори потвърждават изразеното антибактериално действие на Er:YAG лазера спрямо различни МО в устната кухина [219, 221, 322, 326]. Sharon-Buller и кол. (2003) установяват значителна редукция на МО при лазерна кавитетна препарация. В 90% от кавитетите се установява липса на МО, а в останалите 10% количеството на МО е значително по-малко от това при използване на конвенционални техники за кавитетна препарация [261]. Добър антибактериален ефект на Er:YAG лазерът, но по-слабо изразен от този на NaOCl срещу *E. faecalis*, е доказан от Meire и кол. (2012) [204]. Някои автори установяват липса на размазан пласт и наличие на отворени дентинови каналчета при лазерна кавитетна препарация [140, 167, 231, 266].

В научната литература съществуват и данни за недостатъчно добър антибактериален ефект на Er:YAG лазера, при който се доказва само частично намаляване на броя на живите МО [59, 308, 310]. **Резултатите от настоящото изследване потвърждават наличието на статистически значима редукция на МО, но тя е под 50%.**

Анализът с непараметричния тест на McNemar показва, че и при трите използвани в нашето изследване антибактериални способа (ФДТ, 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 антимикробен ефект на Er:YAG лазера, сравнен с ФДТ [204].

Анализът на данните от трите групи (ФАД, Тубулицид и Er:YAG лазер) с непараметричния тест на Kruskal-Wallis доказва 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), можем да обобщим, че ФАД и Тубулицид имат мощен, а Er:YAG лазерът – средно изразен антибактериален ефект.** Смятаме, че доказаният най-добър антимикробен 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 [173]. **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.

## VII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Целта на настоящата разработка е да се проучи чрез експериментални и клиничко-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  $\alpha$ ,  $\beta$  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  $\alpha$  и ZnPc е 1  $\mu$ M, докато за  $\beta$  е 4  $\mu$ M.

**1.4.** Цитотоксичност под 50% се установява за ФС  $\alpha$  при концентрация под 4  $\mu$ M, за ZnPc – под 2  $\mu$ M, и за  $\beta$  – 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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 за 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 антимикробната 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 антиминокробния ефект между него и ФАД е статистически значима.

## VIII. 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 ( $\lambda=665, 1064$  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 подготовка 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  $5.5^{\circ}\text{C}$  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 антимикробен ефект е установен при прилагане на Fotosan с изключение на пробите с *C. albicans*, които се повлияват най-добре от ZnPc.

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 антимикробно действие има Ег:УАГ лазерът (46.67%) – разликата с ФАД е статистически значима. Препоръчваме след лазерна подготовка допълнителна медикация на кавитета преди obtуриране.

## IX. БИБЛИОГРАФИЯ

1. *Балчева, Е.* Биологични методи при пулпитолечение. Стоматология, 1955; 1.
2. *Балчева, Е. Н.* и кол. Физиотерапия при стоматологичните заболявания. Клиника на терапевтичната стоматология. С., Медицина и физкултура, 1990.
3. *Ботушанов, П., С. Владимиров.* Ендодонтия. Пловдив, Автоспектър, 1998.
4. *Ботушанов, П., С. Владимиров, З. Иванова.* Кариесология и оперативно зъболечение. Пловдив, Автоспектър, 1997.
5. *Ботушанов, П., Б. Дачев.* Медикаментозно повлияване на дентина и пулпата при лечение на дълбокия кариес. С., Стоматология, 1980; 5: 315–324.
6. *Бусыгина, М. В.* Болести зъбов и зистой обложки полости рта. М., „Медицина“, 1972.
7. *Варнке, У.* В началото беше светлина. Dental алманах, 2004; 10: 108–111.
8. *Вил, Г.* Работата е тъкмо в дължината на вълната (клинични възможности за употреба на различни типове лазер). Dental алманах, 2004; октомври: 156–163.
9. *Влахова, А., Хр. Кисов, Е. Попова, Сл. Димитров, В. Мантарева, И. Ангелов, В. Късовски.* Фотодинамична терапия в денталната медицина. СДК и НУС, 2009; 3: 113–127.
10. *Георгиева, Цв.* Възможности на фотоактивираната дезинфекция и излъчването на Nd:YAG лазер за елиминиране на ендодонтската микрофлора. Канд. дисерт., С., Факултет по дентална медицина, 2015.
11. *Гергова, Р.* Микробиологични, имунологични и молекулярно-генетични проучвания върху изолати *Moraxella catarrhalis* от болни с респираторни инфекции. Канд. дисерт., 2008.
12. *Гергова, Р., И. Митов, Т. Кантарджиев.* Селективна среда за изолиране на *Moraxella (Branhamella) catarrhalis* и *Haemophilus spp.* в

материали от респираторен тракт. Инфектология, 2002; XXXIX (2): 34–37.

13. Гергова, Р., И. Митов, П. Минчев. Критерии за изолиране и оценяване на клиничното значение на *Moraxella (Branhamella) catarrhalis* в материали от респираторен тракт. Съвременна медицина, 2003; LIV (5): 3–10.

14. Григорьян, А. С. Морфология и хистохимия пулпы зубов в норме и при воспалении. М., Стоматология, 1965;44 (50): 20–27.

15. Гуткнехт, Н. Лазерът в ендодонтията. Dental алманах, 2004; октомври: 144–151.

16. Дачев, Б. Проучване влиянието на йонизиращата радиация върху зъбите, пародонта и устната лигавица. Канд. дисерт., С., Стоматологичен факултет, 1968, 238 стр.

17. Дачев, Б. Заболявания на зъбната пулпа. (Етиология, клиника, терапия и профилактика). Дисерт., С., Стоматологичен факултет, 1975, 695 стр.

18. Дачев, Б., Е. Дюлгерова, Сл. Димитров, и др. Сканираща електронна микроскопия на зъбна повърхност, облъчана с ИАГ-неодимов лазер при експеримент *in vivo* на кучета. С., Пробл. на стоматологията, 1987; 15: 3–8.

19. Дачев, Б., Л. Райчев, Е. Дюлгерова, Сл. Димитров, Сн. Топалова. Възможности за приложението на лазерите при лечението и профилактиката на зъбния кариес. С., Стом., 1985; 67 (6): 84–89.

20. Димитров, Сл., Б. Дачев, Л. Райчев и др. Редукция на зъбния кариес посредством облъчване с ИАГ-неодимов лазер – експеримент с плъхове. С., Стом., 1988; 70 (1): 17–20.

21. Димитров, Сл., Л. Райчев. Изследване върху киселинната устойчивост на емайл на интактни зъби, облъчени с лазери с  $\text{CO}_2$ , медни пàри и итриево-алуминиев гранат, активиран с неодим. С., Стом., 1986; 68 (4): 19–25.

22. Евдокимов, А. И., А. И. Рыбаков. Руководство по терапевтической стоматологии. М., Медицина, 1967.

23. *Жегова, Г.* Приложение на Er:YAG лазер при лечение на кариес в детска възраст – експериментални, клинични и психологични аспекти. Канд. дисерт., С., Факултет по дентална медицина, 2014.
24. *Иванов, В. С., Л. И. Урбановия, В. П. Бережной.* Воспаление пульпы зуба. М., Изд. „Медицина”, 1990.
25. *Кирилова, Ж.* Глас-йонимерните цименти като биоматериал за лечение на апроксимален кариес на дъвкателните зъби („сандвич обтурации”). Канд. дисерт., С., Факултет по дентална медицина, 2013.
26. *Лукомский, И. Г.* Терапевтическая стоматология. М., Медгиз., 1955.
27. *Мантарева, В., И. Ангелов, В. Късовски, Сл. Димитров.* Фотодинамично-активни комплекси за денталната медицина: състояние на проблема, развитие, перспективи. С., Химия и индустрия, 2009; 80 (1–2): 1–7.
28. *Митов, И., Р. Гергова, М. Тихолова.* Микрофлора на устната кухина и горните дихателни пътища. Съвременна медицина 1999: 5–6: 3–10.
29. *Митов, Г., Н. Цанев, Ю. Дочева и кол.* Микробиология. С., Медицинско издателство „АРСО”, 2000.
30. *Мострова, И.* Влияние на възрастта върху биологичния потенциал на зъбната пулпа с оглед възможност за биологично лечение. С., Стоматологичен преглед, 1983; 2: 3–11.
31. *Мострова, И.* Термодиагностика при отчитане на резултатите след биологично лечение с витална ампутация. С., Стоматология, 1990; 3:8–14.
32. *Мострова, И., Ц. Узунов.* Приложение на паста „Фитопулп“ и хелий-неонов лазер при лечение на зъбната пулпа. С., Актуална стоматология, 1997; 1: 24–27.
33. *Муртазлиева, Г. Г.* Изменения в пульпе зуба при препарировании искусственных полостей. М., Стом. 1978; 57 (4): 5–11.
34. *Оленчич, С. М.* Морфологическое и гистохимическое изменение в пульпе и гассеровых узлах после препарирования зубов. М, Стом., 1971; 50 (6): 37–11.

35. *Писарев, Ю.* Нов метод за щадящо лечение на серозно възпалената зъбна пулпа с ултракъси вълни (УВЧ, УКВ). Канд. дисерт., С., НИИКФ, 1969, 218 стр.

36. *Прохончуков, А. А., Н. А. Жижина, А. Н. Балашов, А. А. Кунин, Л. А. Мозговая, А. Б. Виноградов, В. И. Вахтин, А. Г. Колесник, Е. П. Михайлова, В. А. Сапрыкина, Ю. С. Назыров.* Лазерная физиотерапия стоматологических заболеваний. М., Стоматология, 1995; 74 (6): 23–34.

37. *Радева, Е.* Терапевтично повлияване на микрофлората и болката при остър апикален периодонтит – начална форма, без клинични данни за ексудация в кореновия канал. Канд. дисерт., С., Факултет по дентална медицина, 2012.

38. *Райчев, Л., Б. Дачев, Сл. Димитров, и др.* Промени в емайла и пулпата на зъби от опитни животни, облъчвани с ИАГ-неодимов лазер. Доклад на III нац. конф. с международно участие. Оптика и лазерна техника – ОПТИКА, 1987, 18–20 май, 1987, Варна, II том, София, 1987, 501–504.

39. *Рашкова, М.* Микроинвазивен подход при лечение на кариес при деца – съвременни аспекти. С., Проблеми на денталната медицина, 2013; 39 (2): 70–81.

40. *Свраков, Д., К. Кеворкян.* Биологично лечение на възпалената зъбна пулпа. С., Мед. и физк., 1959.

41. *Свраков, Д., Б. Дачев.* Заболявания на зъбната пулпа. С., Мед. и физк., 1978.

42. *Семлер, Р.* СО<sub>2</sub> лазер. Dental алманах 2004; 10: 112–114.

43. *Стоянчева, Н.* Клинични проучвания върху въздействието на калцецецина при лечение на дълбокия кариес. С., Стом., 1980; 2: 88–90.

44. *Стоянчева, Н.* Промени в зъбната пулпа при лечение на дълбокия кариес с различни видове подложки. Експериментални, лабораторни и клинични проучвания. Канд. дисерт., С., Стоматологичен факултет, 1986, 175 стр.

45. *Топалова-Пиринска, Сн.*, Е. Карова. Клинично поведение при лечение на зъбния кариес и неговите усложнения. Изд. “Скала Принт”, 2013.
46. *Тројачанец, З.* Биостимулирачки ласери во стоматологијата. Европа 92, Кочани, Скопије, 1995.
47. *Тројачанец, З.* Примена на биостимулирачки ласери во стоматологијата. Херкли комерц Битола, Скопије, 2002.
48. *Узунов, Ц.* Експериментални и клинични истражувања за влијанието на хелий-неоновия лазер при хроничен пародонтит. Канд. дисерт., С., Стоматологичен факултет, 2000, 174 стр.
49. *Хайдеман, Д.* и кол. Ендодонтија (под редакцијата на проф. Инджов). Медицинско издателство „Шаров”, С., 2002.
50. *Цанова, Сн.* Биологично лечение на реверзиблени пулпити со калиев нитрат во поликарбоксилатен цемент. (Експериментални и клинични истражувања). Канд. дисерт., Пловдив, Стоматологичен факултет, 2002, 112 стр.
51. *Цветкова-Цанкова, П.* Биологично лечение на хроничен улцерозен пулпит. (Лабораторни, експериментални и клинични истражувања). Канд. дисерт., С., Стоматологичен факултет, 1983, 178 стр.
52. *Швариц, Р.* и кол. Основи на оперативното зъболечение (под редакцијата на проф. Инджов). С., Медицинско издателство „Шаров”, 2000.
53. *Јанкова, М.* Врху дијагностиката и биологичното лечение на воспалителните заболувања на зъбната пулпа. Канд. дисерт.. С., Стоматологичен факултет, 1959, 300 стр.
54. *Acharya, S.*, T. Satyanarayana, R. Prabhakar. Lasers in dentistry-a review. Annali and Essences in dentistry, 2012; IV (4): 63–72.
55. *Aksakalli, S.*, D. Abdullah, M. Selek, S. Tasdemir. Temperature increase during orthodontic bonding with different curing units using an infrared camera. Acta Odontologica Scandinavica, 2014; 72 (1): 36–41.
56. *Al-Batayneh. O.*, W. Seow, L. Walsh. Assessment of Er:YAG laser for cavity preparation in primary and permanent teeth: a scanning

electron microscopy and thermographie study. *Pediatric dentistry*, 2014; 36 (3): E90–E94.

57. *Allen, T., D. Moore, X. Wang, V. Casu, R. May, M. Lerner, C. Houchen, D. Brackett, M. Huycke.* Dichotomous metabolism of *Enterococcus faecalis* induced by hematin starvation modulates colonic gene expression. *J Med Microbiol.*, 2008; 57 (10): 1193–1204.

58. *Almahdy, A., F. C. Downey, S. Sauro, R. J. Cook, M. Sherriff, D. Richards, T. F. Watson, A. Banerjee, F. Festy.* Microbiochemical analysis of carious dentine using raman and fluorescence spectroscopy. *Caries Res.*, 2012; 46: 432–440.

59. *Ando, Y., A. Aoki, M. Umeda et al.* Bactericidal effect of Er-YAG laser on periodontopathic bacteria. *J Dent Res*, 1993; 72: 246.

60. *Aoki, A., I. Ishikawa, T. Yamada et al.* Comparison between Er:YAG laser and conventional technique for root caries treatment in vitro. *J. Dent. Res.*, 1998; 77: 1404–1414.

61. *Araújo, P. V., K. I. Teixeira, L. D. Lanza, M. E. Cortes, L. T. Poletto.* In vitro lethal photosensitization of *Streptococcus mutans* using methylene blue and toluidine blue O as photosensitizers. *Acta Odontol Latinoam*, 2009; 22: 93–97.

62. *Arcoria, C. J., M. Dusek, B. Vitasek-Arkoria B.* Pulpal effects of a high rep rate Nd:YAG laser. *J Clin Laser Med Surg*, 1994; 12 (1): 21–25.

63. *Armengol, V., A. Jean, M. Marion.* Temperature rise during Er:YAG and Nd:YAG laser ablation of dentin. *Journal of Endodontics* 2000; 26 (3): 138–141.

64. *Armengol, V., A. Jean, R. Rohanizadeh, H. Hamel.* Scanning Electron Microscopic Analysis of Diseased and Healthy Dental Hard Tissues after Er:YAG Laser Irradiation:In Vitro Study. *Journal of Endodontics*, 1999; 25 (8): 543–546.

65. *Arneiro, R., R. Nakano, L. Antunes, G. Ferreira, K. Fontes, L. Antunes.* Efficacy of antimicrobial photodynamic therapy for root canals infected with *Enterococcus faecalis*. *Journal of Oral Science*, 2014; 56 (4): 277–285.

66. *Attrill, D. C., R. Davies, T. King, M. Dickinson, A. Blinkhorn.* Thermal effects of the Er:YAG laser on a simulated dental pulp: a quantitative evaluation of the effects of a water spray. *J. Dent.*, 2004; 32: 35–40.
67. *Avery, J.* Repair potential of the pulp. *J. Endod*, 1981; 5: 205–212.
68. *Ayukawa, J.* Pulpal response of human teeth to biocompatible pulp capping agent. *Japan J. Conc. Dent*, 1993; 36: 1146–1159.
69. *Barbosa, P., D. A. Duarte, M. F. Leite, G. R. de Sant'Anna.* Photodynamic therapy in pediatric dentistry. *Case Rep Dent*, 2014:1–5.
70. *Ben-Amar, A., R. Liberman, C. Gorfil et al.* Changing concept of cavity toilet. A review. *Dent Med*, 1985; 3 (10–12).
71. *Ben-Amar, A., R. Liberman, L. Serebro, P. Moses.* The effect of dentinal pretreatment on microleakage in Class V composite resin restorations with two dentinal adhesive systems. *Quintessence International*, 1989; 20 (12): 903–905.
72. *Bergenholtz, G., C. F. Cox, W. J. Loesche, S. A. Syed.* Bacterial leakage around dental restorations: its effect on the dental pulp. *Oral Pathol*, 1982; 11: 439–450.
73. *Bergman, K., C. T. O'konski.* A spectroscopic study of methylene blue monomer, dimer and complexes with montmorillonite. *J Phys Chem*, 1963; 67: 2169–2177.
74. *Bernard, V., E. Staffa, V. Mornstein, A. Bourek.* Infrared camera assessment of skin surface temperature – Effect of emissivity. *Physica Medica*, 2013; 29: 583–591.
75. *Bevilacqua, I. M. et al.* The impact of photodynamic therapy on the viability of *Streptococcus mutans* in a planktonic culture. *Photomed Laser Surg*, 2007; 25: 513–514.
76. *Biagioni, P., D. Hussey, C. Mitchell, D. Russell, P. Lamay.* Thermographic assessment of dentine pin placement. *Journal of Dentistry*, 1996; 24 (6): 443–447.

77. *Björndal, L., T. Larsen.* Changes in the cultivable flora in deep carious lesions following a stepwise excavation procedure. *Caries Res.*, 2000; 34: 502–508.
78. *Björndal, L., T. Larsen, A. Thylstrup.* A clinical and microbiological study of deep carious lesions during stepwise excavation using long treatment intervals. *Caries Research*, 1997; 31 (6): 411–417.
79. *Bolean, M., T. P. Paulino, J. G. Thedei, P. Ciancaglini.* Photodynamic therapy with rose bengal induces GroEL expression in *Streptococcus mutans*. *Photomed Laser Surg*, 2010; 28 (Suppl.): 79–84.
80. *Bonnett, R.* Photosensitizers of the porphyrin and phthalocyanine series for photodynamic therapy. *Chemical society reviews*, 1995: 19–33.
81. *Brännström, M.* Infection beneath composite resin restorations. Can it be avoided? *Oper Dent*, 1987; 12: 158–163.
82. *Brännström, M., G. Johnson.* Effects of various conditioners and cleaning agents on prepared dentin surfaces, a scanning electron microscopic investigation. *J Prosthet Dent*, 1974; 31:422–430.
83. *Brännström, M., K. Nordenvall, P. Glanz.* The effect of EDTA containing surface active solutions on the morphology of prepared dentin. An in vitro study. *J Dent Res*, 1980; 59:1127–1131.
84. *Burkes, E. J., J. Hoke, E. Gomes, M. Wolbarsht.* Wet versus dry enamel ablation by Er:YAG laser. *J Prosthet Dent*, 1992; 67: 847–851.
85. *Burns, T., M. Wilson, G. J. Pearson.* Sensitization of cariogenic bacteria to killing by light from a helium-neon laser. *J Med Microbiol*, 1995; 38: 401–405.
86. *Calland, J. W., S. E. Harris, D. Carnes.* Human pulp cells respond to Calcitonin gene-related peptide in vitro. *Journal of Endodontics*, 1997; 23 (8): 485–489.
87. *Cavalcanti, B. N., J. L. Lage-Marques, S. M. Rode.* Pulpal temperature increases with Er:YAG laser and high-speed handpieces. *J Prosthet Dent*, 2003; 90 (11): 447–451.
88. *Ceballos, L., R. Osorio, M. Toledano.* Microleakage of composite restorations after Er:YAG laser irradiation versus acid-etched. *J Dent Res*, 2000; 79: 536.

89. *Chan, W. S., J. F. Marshall, R. Svensen, D. Phillips, I. R. Hart.* Photosensitising activity of phthalocyanine dyes screened against tissue culture cells. *Photochemistry and Photobiology*, 1987; 45 (6): 757–761.
90. *Chen, Z., S. Zhou, J. Chen, L. Li, P. Hua, S. Chen, M. Huang.* An effective zinc phthalocyanine derivative for photodynamic antimicrobial chemotherapy. *Journal of Luminescence*, 2014; 152: 103–107.
91. *Coluzzi, D. J.* Fundamentals of dental lasers: science and instruments. *Dent Clin N Am*, 2004; 48: 751–770.
92. *Corona, S., M. C. Borsatto, R. G. Dibb, R. P. Ramos, A. Brugnera, J. D. Pecora.* Microleakage of class V resin composite restorations after bur, air-abrasion or Er:YAG laser preparation. *Operative Dentistry*, 2001; 26: 491–497.
93. *Correa-Afonso, A., R. Palma-Dibb.* Thermal effects caused by different methods of cavity preparation. *J Oral Laser Applications*, 2007; 7 (2):115–121.
94. *Da Costa, A., J. Chibebe Junior, C. A. Pereira, A. K. da Silva Machado, M. Beltrame Junior, J. C. Junqueira, A. O. C. Jorge.* Susceptibility of planktonic cultures of *Streptococcus mutans* to photodynamic therapy with a light-emitting diode. *Braz Oral Res.*, 2010; 24 (4): 413–418.
95. *Da Costa Fontes K. B. F., B. F. Vieira, A. Takahama, R. De Souza Azevedo, C. Barroso, D. Resende, E. P. Dias.* Antimicrobial photodynamic therapy: A new approach for oral candidiasis? *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology & Oral Radiology*, 2014; 117 (2): 121.
96. *Cox, C. F.* Microleakage related to restorative procedures. *Proceeding of the finish Dental Society*, 1992.
97. *Cox, C. F., C. L. Keall, H. J. Keall, E. Ostro, G. Bergenholtz.* Biocompatibility of surface-sealed dental materials against exposed pulps. *The Journal of prosthetic dentistry*, 1987; 57 (1): 1–8.
98. *Cozean, C., C. Arcoria, J. Pelagalli, G. Powell.* Dentistry for the 21<sup>st</sup> century? Erbium:YAG laser for teeth. *JADA*, 1997; 128 (August): 1080–1087.
99. *Craig, R. G., P. E. Gehring, F. A. Peyton.* Relation of structure to the microhardness of human dentin. *J. D. Res.*, 1959; 38 (3): 624–630.

100. *Dahl, T. A., W. R. Midden, P. E. Hartman.* Pure singlet oxygen cytotoxicity for bacteria. *Photochem Photobiol*, 1987; 46: 345–352.

101. *Dai, T., B. Fuchs, J. Coleman, R. Prates, C. Astrakas, T. St. Denis, M. Ribeiro, E. Mylonakis, M. Hamblin, G. Tegos.* Concepts and principles of photodynamic therapy as an alternative antifungal discovery platform. *Front Microbiol.*, 2012; 3: 120.

102. *Dai, T., G. Kharkwal, M. Tanaka, Y. Huang, V. Bil De Arce, M. Hamblin.* Animal models of external traumatic wound infections. *Virulence*, 2011; 2: 296–315.

103. *Dario, M. E., E. S. Román.* Aggregation and photophysics of rose bengal in alumina-coated colloidal suspensions. *Helv Chim Acta*, 2001; 84: 2601–2614.

104. *Dave, D., U. Desai, N. Despande.* Photodynamic therapy: a view through light. *Journal of Orofacial Research*, 2012; 2 (2): 82–86.

105. *Dederich, D. N., R. D. Bushick.* Lasers in dentistry. *JADA*, 2004; 135 (2): 204–210.

106. *Demidiva, T. N., M. R. Hamblin.* Effect of cell – photosensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005; 49 (6): 2329–2335.

107. *Derosa, M. C., R. J. Crutchley.* Photosensitized singlet oxygen and its applications. *Coord Chem Rev*, 2002; 233–234: 351–71.

108. *Dhami, S., D. Phillips.* Comparison of the photophysics of an aggregating and non-aggregating aluminum phthalocyanine system incorporated into unilamellar vesicles. *J Photochem Photobiol A Chem.*, 1996; 100: 77–84.

109. *Dickers, B., L. Lamard, A. Peremans et al.* Temperature rise during photo-activated disinfection of root canals. *Lasers in Medical Science*, 2009; 24: 81–85.

110. *Donnelly, R. et al.* Potential of photodynamic therapy in treatment of fungal infections of the mouth. Design and characterisation of a mucoadhesive patch containing toluidine blue O. *J Photochem Photobiol*, 2007; 86: 59–69.

111. *Dostalova, T., H. Jelinkova, O. Krejsa, H. Hamal, J. Kubelka, S. Prochazka, L. Himmlova.* Dentin and pulp response to Erbium:YAG laser ablation: a preliminary evaluation of human teeth. *J Clin Laser Med Surg*, 1997; 15: 117–121.
112. *Doubenskaia, M., M. Pavlov, S. Grigoriev, I. Smurov.* Definition of brightness temperature and restoration of true temperature in laser cladding using infrared camera. *Surface & Coatings Technology*, 2013; 220: 244–247.
113. *Dougherty, T. J., C. J. Gomer, B. W. Henderson et al.* Photodynamic therapy. *J Natl Cancer Inst.*, 1998; 90: 889–905.
114. *Embleton, L. et al.* Antimicrobial Agents. *Chemother*, 2005; 49: 4690–4701.
115. *Eversole, L. R., I. Rizoiu.* Preliminary investigation on the utility of an erbium, chromium YSGG laser. *Calif Dent Assoc J*, 1995; 23:41–47.
116. *Featherstone, J. D. B., S. Doméjean.* Minimal intervention dentistry: part 1. From compulsive restorative dentistry to rational therapeutic strategies. *British Dental Journal*, 2012; 213 (9): 441–445.
117. *Fekrazada, R., F. Khoeib, N. Hakimiha, A. Bahador.* Photoelimination of *Streptococcus mutans* with two methods of photodynamic and photothermal therapy. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2013: 1–6.
118. *Fontana, C., A. D. Abernethy, S. Som, K. Ruggiero, S. Doucette, R. C. Marcantonio, C. I. Boussios, R. Kent, J. M. Goodson, A. Tanner, N. S. Soukos.* The antibacterial effect of photodynamic therapy in dental plaque-derived biofilms. *J Periodont Res* 2009; 44:751–759.
119. *Foschi, F., C. Fontana, K. Ruggiero et al.* Photodynamic inactivation of *Enterococcus faecalis* in dental root canals in vitro. *Lasers in Surgery and Medicine*, 2007; 39: 782–787.
120. *Franz, A., T. Spinell, A. Graf, H. Wutzel, R. Liska, D. C. Watts, A. Moritz, A. Schedle.* Cytotoxicity of post and core composites as a function of environmental conditions. *Dental Materials*, 2014; 30 (10): 1179–1186.

121. *Fraunhofer, von J. A.*, D. J. Allen, G. M. Orbell. Laser etching of enamel for direct bonding. *Angle Orthod*, 1993; 63 (1): 73–76.
122. *Frencken, J.* Evolution of the ART approach: highlights and achievements. *Journal of Applied Oral Science*, 2009; 17.
123. *Fried, D.*, N. Ashouri, T. Breunig, R. Shori. Mechanism of water augmentation during IR laser ablation of dental enamel. *Lasers in Surgery and Medicine*, 2002; 31: 186–193.
124. *Fried, N.*, D. Fried. Comparison of Er:YAG and 9.6  $\mu\text{m}$  TE CO<sub>2</sub> lasers for ablation of skull tissue. *Lasers in Surgery and Medicine*, 2001; 28: 335–343.
125. *Fried, D.*, J. Ragadio, A. Champion. Residual heat deposition in dental enamel during IR laser ablation at 2.79, 2.94, 9.6, and 10.6  $\mu\text{m}$ . *Lasers in Surgery and Medicine*, 2001; 29: 221–229.
126. *Gambarini G.*, G. Plotino, N. M. Grande, G. Nocca, A. Lupi, B. Giardina, M. De Luca. In vitro evaluation of the cytotoxicity of FotoSan™ light-activated disinfection on human fibroblasts. *Med Sci Monit.*, 2011; 17: 21–25.
127. *Garson, J.*, T. Riddler, D. Nash. A thermographic study of heat distribution during ultra speed cavity preparation. *J. dent. Res*, 1979; 58 (7): 1681–1684.
128. *George, S.*, A. Kishen. Influence of photosensitizer solvent on the mechanisms of photoactivated killing of *Enterococcus faecalis*. *Photochemistry and Photobiology* 2008; 84:734–740.
129. *Geraldo-Martins, V.*, E. Tanji, N. Wetter, R. Nogueira, C. Eduardo. Intrapulpal temperature during preparation with the Er:YAG: an in vitro study. *Photomed Laser Surg*, 2005; 23:182–186.
130. *Giro, E. M. A.*, J. O. Gondim, J. Hebling, C. A. de Souza Costa. Response of human dental pulp to calcium hydroxide paste preceded by a corticosteroid/ antibiotic dressing agent. *Braz J Oral Sci.*, 2010; 9 (3): 337–344.
131. *Giroldo, L.*, M. Felipe, M. De Oliveira, E. Munin, L. Alves, M. Costa. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) with methylene

blue increases membrane permeability in *Candida albicans*. *Lasers Med. Sci.*, 2009; 24: 109–112.

132. *Giuliani, F.*, M. Martinelli, A. Cocchi, D. Arbia, L. Fantetti, G. Roncucci. In vitro resistance selection studies of RLP068/Cl, a new Zn (II) phthalocyanine suitable for antimicrobial photodynamic therapy. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2010; 54 (2): 637–642.

133. *Giusti, J.*, L. Santos-Pinto, A. Pizzolito, K. Helmersen, E. Carvalho-Filho, C. Kurachi et al. Antimicrobial photodynamic action on dentin using a light-emitting diode light source. *Photomed Laser Surg*, 2008; 26(4): 281–287.

134. *Glockner, K.*, J. Rumpler, K. Ebeleseder, P. Stadler. Intrapulpal temperature during preparation with the Er:YAG laser compared to the conventional bur: an in vitro study. *J Clin Laser Med Surg*, 1998; 16: 153–157.

135. *Goldberg, M.*, N. Six, F. Decup, J. J. Lasfargues, E. Salih, K. Tompkins, A. Veis. A Bioactive molecules and the future of pulp therapy. *American Journal of Dentistry*, 2003; 16 (1): 66–76.

136. *Goldberg, M.*, A. J. Smith. Cells and extracellular matrices of dentin and pulp: A biological basis for repair and tissue engineering. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 2004; 15 (1): 13–27.

137. *Gonzales, F. P.*, F., T. Maisch. Photodynamic inactivation for controlling *Candida albicans* infections. *Fungal biology*, 2012; II6, I-IO: 1–9.

138. *Goodis, J. E.* et al. The effect of glass ionomer liners in lowering pulp temperatures during composite placement in vitro. *Dent Mater*, 1993; 9 (3): 146–150.

139. *Gouw-Soares, S.*, J. Pelino, P. Haypek, L. Bachmann, C. Eduardo. Temperature rise in cavities prepared in vitro by Er:YAG laser. *J Oral Laser Applications*, 2001; 1: 119–123.

140. *Gurbuz, T.*, F. Sengul, T. Demirci, M. Coruh. Scanning electron microscopic analyses of the effects of different disinfectant methods of dentinal structure. *Journal of International Dental and Medical Research*, 2013; 6 (2): 65–68.

141. *Gurgan, S., S. Bolay, A. Kiremitci.* Effect of disinfectant application methods on the bond strength of composite to dentin. *Journal of Oral Rehabilitation*, 1999; 26 (10): 836–840.

142. *Gursoy, H., C. Ozcakir-Tomruk, J. Tanalp, S. Yılmaz.* Photodynamic therapy in dentistry: a literature review. *Clin Oral Invest*, 2013; 17: 1113–1125.

143. *Hajim, K., D. Salih, Y. Rassam.* Laser light combined with a photosensitizer may eliminate methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *Lasers Med Sci*, 2010; 25:743–748.

144. *Hakimina, N., F. Khoei, A. Bhador, R. Fekrazad.* The susceptibility of *Streptococcus mutans* to antibacterial photodynamic therapy: a comparison of two different photosensitizers and light sources. *J Appl Oral Sci.*, 2014; 22 (2): 80–84.

145. *Hamblin, M. R., T. Hasan.* Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem Photobiol Sci*, 2004; 3: 436–450.

146. *Hecker, S., K. A. Hiller, K. M. Galler, S. Erb, T. Mader, G. Schmalz.* Establishment of an optimized ex vivo system for artificial root canal infection evaluated by use of sodium hypochlorite and the photodynamic therapy. *International Endodontic Journal*, 2013; 46: 449–457.

147. *Heinrich, R., Kneist, S.* Mikrobiologisch-histologisch kontrollierte Therapiestudie zur Effektivitätsbewertung der einzeitigen und schrittweisen Caries-profunda – Therapie. *Stomatol. DDR*, 1988; 38 (10), 693–698.

148. *Hibst, R., U. Keller.* Experimental studies of the application of the Er:YAG laser on dental hard substances. I. Measurement of the ablation rate. *Lasers Surg Med*, 1989; 9: 338–344.

149. *Hibst, R., U. Keller.* Effects of water spray and repetition rate on temperature elevation during Er:YAG laser ablation of dentin. *SPIE 2623*, 1996: 130–144.

150. *Hibst, R., U. Keller, R. Steiner.* Die Wirkung gepulster Er:YAG Laserstrahlung auf Zahngewebe. *Laser Med Surg*, 1988; 4: 163–165.

151. *Hibst, R., K. Stock, U. Keller.* Controlled tooth surface heating and sterilization by Er:YAG laser radiation. *Proc SPIE*, 1996; 2992: 119–126.
152. *Hofman, J. T., B. Pathiraj, J. van Dijk, D. F. de Lange, J. Meijer.* A camera based feedback control strategy for the laser cladding process. *Journal of Materials Processing Technology*, 2012; 212: 2455–2462.
153. *Hoke, J. A., E. J. Burkes, E. D. Gomes, B. A. Hooper, W. L. Wolbarst.* The effect of free electron laser light on tooth structure. *Lasers in life sciences*, 1995; 6: 251–7.
154. *Hope, C. K., M. Wilson.* Induction of lethal photosensitization in biofilms using a confocal scanning laser as the excitation source. *J Antimicrob Chemother*, 2006; 57: 1227–1230.
155. *Hoshino, E., N. Ando, M. Sato, K. Kota.* Bacterial invasion of non-exposed dental pulp. *Int. Endod. J.*, 1992; 25 (1): 2–5.
156. *Ismail, A. I. et al.* Caries management pathways preserve dental tissues and promote oral health. *Community Dent Oral Epidemiol*, 2013; 41: e12–e40.
157. *Ito, T.* Toluidine blue: the mode of photodynamic action in yeast cells. *Photochem. Photobiol.*, 1977; 25: 47–53.
158. *Kalnins, V., H. E. Frisbie.* The effect of dentine fragments on the healing of the exposed pulp. *Archives of Oral Biology*, 1960; 2 (2): 96–100.
159. *Kardos, T. B., A. R. Hunter, S. M. Hanlin, E. E. Kirk.* Odontoblast differentiation: a response to environmental calcium? *Endod Dent Traumatol*, 1998; 14 (3): 105–111.
160. *Karu, T. I.* Primary and secondary mechanisms of action of visible to near IR radiation on cells. *J Photochem. Photobiol. B Biol.*, 1999; 49, 1.
161. *Karu, T. I.* Low-power laser effects. In: *Lasers in Medicine*. Waynant, R., Ed. CRC Press, Boca Raton, FL., 2002, p.169.
162. *Kashef, N., G. R. S. Abadia, G. E. Djavid.* Phototoxicity of phenothiazinium dyes against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and multi-drug resistant *Escherichia coli*. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2012; 9: 11–15.

163. *Keller, U., R. Hibst.* Experimental studies of the application of the Er:YAG laser on dental hard substances. II. Light microscopic and SEM investigations. *Lasers Surg Med*, 1989; 9: 345–351.

164. *Keller, U., R. Hibst.* Effects of Er:YAG laser in caries treatment: a clinical pilot study. *Lasers Surg. Med.*, 1997; 20: 32–38.

165. *Keller, U., W. H.-M. Raab, R. Hibst.* Die Pulpa reaktion wahrend der Bestrahlung fon Zahnhartsubstanzen mit dem Er:YAG Laser. *Dtsch Zahnartzl Z*, 1991; 46 (2): 158–160.

166. *Kerstein, R., T. Lister, R. Cole.* Laser therapy and photosensitive medication: a review of the evidence. *Lasers Med Sci*, 2014; 2: 1–4.

167. *Kilinc, E., D. Roshkind, S. Antonson, D. Antonson, P. Hardigan, S. Siegel, J. Thomas.* Thermal safety of Er:YAG and Er,Cr:YSGG Lasers in hard tissue removal. *Photomedicine and Laser Surgery*, 2009; 27 (4): 565–570.

168. *Kim, Y. G.* Laser mediated production of reactive oxygen and nitrogen species; implication for therapy. *Free Radic Res.*, 2002; 36 (12): 1243–1250.

169. *Kimura, Y., P. Wilder-Smith, K. Matsumoto.* Lasers in endodontics:areview. *International Endodontic Journal*, 2000; 33: 173–185.

170. *King, J. B., J. J. Crowford, R. L. Lindabl.* Indirect pulp capping: a bacteologic study of deep carious dentine in human teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 1965; 20: 66–39.

171. *Kodonas, K., C. Gogos, C. Tziafa.* Effect of simulated pulpal microcirculation on intrachamber temperature changes following application of various curing units on tooth surface. *Journal of Dentistry*, 2009; 37 (6): 485–490.

172. *Kömerik, N., A. J. Macrobert.* Photodynamic therapy as an alternative antimicrobial modality for oral infections. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, 2006; 25: 487–504.

173. *Konopka, K., T. Goslinski.* Photodynamic therapy in dentistry. *J Dent Res*, 2007; 86(8): 694–707.

174. *Kotlow, L. A.* Lasers in pediatric dentistry. *Dent Clin N Am*, 2004; 48: 889–922.

175. *Kranz, S., A. Guellmar, A. Völpel, B. Gitter, V., Albrecht, B. Sigusch.* Photodynamic suppression of *Enterococcus faecalis* using the photosensitizer mTHPC. *Lasers Surg Med.*, 2011; 43 (3): 241–8.

176. *Lambrechts, S. A. G., M. C. G. Aalders, J. Van Marle.* Mechanistic study of the photodynamic inactivation of *Candida albicans* by a cationic porphyrin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2005; 49 (5): 2026–2034.

177. *Lelievre, D., P. Justine, F. Christiaens, N. Bonaventure, J. Coutet, L. Marrot, J. Cotovio.* The episkin phototoxicity assay (EPA): Development of an in vitro tiered strategy using 17 reference chemicals to predict phototoxic potency. *Toxicology in vitro*, 2007; 21: 977–995.

178. *Lima, J. P., M. A. Melo, F. M. Borges et al.* Evaluation of the antimicrobial effect of photodynamic antimicrobial therapy in an in situ model of dentine caries. *Eur J Oral Sci*, 2009; 117: 568–574.

179. *Lima, J., M. Sampaio de Melo, F. Borges, A. Teixeira, C. Steiner-Oliveira, M. Nobre dos Santos et al.* Evaluation of the antimicrobial effect of photodynamic antimicrobial therapy in an in situ model of dentine caries. *Eur J Oral Sci*, 2009; 117 (5): 568–574.

180. *Lin, C., B. Lee, F. Lin, S. Kok, V. Lan.* Phase, compositional and morphological changes of human dentin after Nd:YAG laser treatment. *Journal of Endodontics*, 2001; 27 (6): 389–393.

181. *Liu, S., P. Farahmand, R. Kovacevic.* Optical monitoring of high power direct diode laser cladding. *Optics & Laser Technology*, 2014; 64: 363–376.

182. *Liu, Y. C., J. H. Wei, Z. F. Chen, M. Liu, Y. Q. Gu, K. B. Huang, Z.Q. Li, H. Liang.* The antitumor activity of zinc (II) and copper (II) complexes with 5,7-dihalo-substituted-8-quinolinoline. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2013; 69: 554–563.

183. *Liu, H., X. Wei, J. Ling, W. Wang, X. Huang.* Biofilm formation capability of *Enterococcus faecalis* cells in starvation phase and its susceptibility to sodium hypochlorite. *Journal of Endodontics*, 2010; 36: 630–635.

184. *Loesche, W. J., M. L. Svanberg, H. R. Pape.* Intraoral transmission of Str. Mutans by dental explorer. *Journal of Dental Research*, 1979; 58 (8): 1765–70.
185. *Lubart, R., Y. Wollman, H. Friedman, S. Rochkind, I. Laulicht.* Effect of visible and near – infrared lasers on cell cultures. *J Photochem. Photobiol. B.*, 1992; 12: 305–310.
186. *Lutfi, A. N., T. P. Kannan, M. N. Fazliah, M. A. Jamaruddin, J. Saidi.* Proliferative activity of cells from remaining dental pulp in response to treatment with dental materials. *Australian Dental Journal*, 2010; 55: 79–85.
187. *Maijala, M., R. Rautemaa, A. Järvensivu, M. Richardson, T. Salo, L. Tjäderhane.* *Candida albicans* does not invade carious human dentine. *Oral Diseases*, 2007; 13: 279–284.
188. *Mainmann, T.,* Stimulated optical radiation in ruby. *Nature*, 1960; 187: 493–494.
189. *Maisch, T.* Anti-microbial photodynamic therapy: useful in the future? *Lasers Med Sci*, 2007; 22: 83–89.
190. *Maisch, T., J. Wagner, V. Papastamou et al.* Combination of 10% EDTA, Photosan™, and a blue light hand-held photopolymerizer to inactivate leading oral bacteria in dentistry in vitro. *J Appl Microbiol*, 2009; 107:1569–1578.
191. *Malik, R., A. Manocha, D. K. Suresh.* Photodynamic therapy – a strategic review. *Indian J Dent Res*, 2010; 21 (2): 285–291.
192. *Maltz, M., F. de Oliveira, W. Fontanella, R. Bianchi.* A clinical, microbiologic, and radiographic study of deep caries lesions after incomplete caries removal. *Restorative dentistry*, 2002; 33 (2): 152–159.
193. *Maltz, M., E. F. Oliveira, V. Fontanella, G. Carminatti.* Deep caries lesions after incomplete dentine caries removal: 40-month follow-up study. *Caries Research*, 2007; 41 (6): 493–496.
194. *Mang, T.* Lasers and light sources for PDT: past, present and future. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 2004; 1: 43–48.
195. *Mantareva, V., I. Angelov, V. Kussovski, D. Woehrle, Sl. Dimitrov.* Metallophthalocyanines as photodynamic sensitizers for treatment

of pathogenic bacteria. Synthesis and singlet oxygen formation. *Chimie bioorganique*, 2009; 62 (12).

196. *Mantareva, V., I. Angelov, V. Kussovski, D. Woehrle, Sl. Dimitrov.* Metallophthalocyanines as photodynamic sensitizers for treatment of pathogenic bacteria. Uptake and photoinactivation properties. *Chimie bioorganique*, 2010; 63 (1).

197. *Mantareva, V., V. Kussovski, I. Angelov, E. Borisova, L. Avramov, G. Schnurpfeild, D. Wöhrle.* Photodynamic activity of water-soluble phthalocyanine zinc (II) complexes against pathogenic microorganisms. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2007; 15: 4829–4835.

198. *Mantareva, V., V. Kussovski, I. Angelov, D. Wöhrle, R. Dimitrov, E. Popova, Sl. Dimitrov.* Non-aggregated Ga (III) – phthalocyanines in the photodynamic inactivation of planktonic and biofilm cultures of pathogenic microorganisms. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 2011; 10: 91–102.

199. *Massey, W. L., D. M. Romberg, N. Hunter, W. R. Hume.* The association of carious dentin microflora with tissue changes in human pulpitis. *Oral Microbiol. Immunol*, 1993; 8 (1): 30–35.

200. *Massler, M.* Pulpal reaction to dental caries. *Int. dent J.*, 1967; 17: 441–460.

201. *Marrot, L., A. Labarussiat, P. Perez, J. R. Meunier.* Use of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a pre-screening approach for assessment of chemical-induced phototoxicity. *Toxicology in vitro*, 2006; 20: 1040–1050.

202. *Martins, J., J. C. Junqueira, R. L. Faria, N. F. Santiago, R. D. Rossoni, C. E. D. Colombo, A. O. C. Jorge.* Antimicrobial photodynamic therapy in rat experimental candidiasis: evaluation of pathogenicity factors of *Candida albicans*. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology & Endodontology*, 2011; 111 (1): 71–77.

203. *Mehl, A., L. Kremers, K. Salzmann, R. Hickel.* 3D volume-ablation rate and thermal side effects with the Er:YAG and Nd:YAG laser. *Dent Mater*, 1997; 13 (97): 246–251.

204. *Meire, M.*, T. Coenye, H. Nelis, R. De Moor. Evaluation of Nd:YAG and Er:YAG irradiation, antibacterial photodynamic therapy and sodium hypochlorite treatment on *Enterococcus faecalis* biofilms. *International Endodontic Journal*, 2012; 45 (5): 482–491.

205. *Meire, M.*, K. De Prijck, T. Coenye, H. J. Nelis, R. De Moor. Effectiveness of different laser systems to kill *Enterococcus faecalis* in aqueous suspension and in an infected tooth model. *International Endodontic Journal*, 2009; 42: 351–359.

206. *Meister, J.*, R. Franzen, K. Forner, H. Grebe. Influence of the water content in dental enamel and dentin on ablation with erbium YAG and erbium YSGG lasers. *Journal of Biomedical Optics*, 2006; 11 (3): 1–7.

207. *Mejare, I.*, B. Mejare, S. Edwardsson. Effect of a tight seal on survival of bacteria in saliva-contaminated cavities filled with composite resin. *Endod Dent Traumatol*, 1987; 3: 6–9.

208. *Mertz-Fairhurst, E. J.*, J. W. Curtis, J. W. Ergle, F. A. Rueggeberg, S. M. Adair. Ultraconservative and cariostatic sealed restorations: results at year 10. *J Am Dent Assoc.*, 1998; 129 (1): 55–66.

209. *Metcalf, D.*, C. Robinson, D. Devine, S. Wood. Enhancement of erithrosine-mediated photodynamic therapy of *Streptococcus mutans* biofilms by light fractionation. *J Antimicrob Chemother*, 2006; 58: 190–192.

210. *Miranda, R.*, E. Santos, R. Souto, H. Gusman, A. Colombo. Ex vivo antimicrobial efficacy of the EndoVac® system plus photodynamic therapy associated with calcium hydroxide against intracanal *Enterococcus faecalis*. *International Endodontic Journal*, 2013; 46: 499–505.

211. *Moalic, E.*, A. Gestalin, D. Quinio, P. Gest, A. Zerilli, A. Le Flohic. The extent of oral fungal flora in 353 students and possible relationships with dental caries. *Caries Res*, 2001; 35: 149–155.

212. *Monteiro-Oliveira, M. P.*, L. K. A. Rodrigues, A. S. de Melo, M. Nobre-dos-Santos. Photodynamic therapy effect in carious bovine dentin-an in vitro study. *The Journal of Oral Laser Application*, 2010; 10(1): 29–36.

213. *De Moor, R. J. G.*, K. I. M. Delmé. Laser-assisted cavity preparation and adhesion to Erbium-lased tooth structure: Part 1. *Journal of Adhesive Dentistry*, 2009; 11 (6): 427–438.

214. Müller, P., B. Guggenheim, P. R. Schmidlin. Efficacy of gasiform ozone and photodynamic therapy on a multispecies oral biofilm in vitro. *Eur J Oral Sci*, 2007; 115: 77–80.

215. Murat, T., L. Türkün, Z. Ergügü, A. Mustafa. Is an antibacterial adhesive system more effective than cavity disinfectants? *American Journal of Dentistry*, 2006; 19 (3): 166–170.

216. Nagasawa, A. et al. Fundamental studies in reactive histological changes in pulp tissue of lased teeth. *J Jap Soc Laser Med Surg.*, 1985.

217. Nagata, J. Y., N. Hioka, E. Kimura, V. R. Batistela, R. S. S. Terada, A. X. Graciano, M. L. Baesso, M. F. Hayacibara. Antibacterial photodynamic therapy for dental caries: Evaluation of photosensitizers used and light source properties. *Photodiagnosis and Photodynamic therapy*, 2012; 9: 122–131.

218. Nagayoshi, M., T. Nishihara, K. Nakashima, S. Iwaki, K. Chen, M. Terashita, C. Kitamura. Bactericidal effects of diode laser irradiation on *Enterococcus faecalis* using periapical lesion defect model. *ISRN Dentistry*, 2011; Article ID 870364: p. 6.

219. Natto, Z. S., M. Aladmawy, P. Levi, H. Wang. Comparison of the efficacy of different types of lasers for the treatment of peri-implantitis: a systematic review. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 2015; 30 (2): 338–345.

220. Neev, J., K. Pham, J. Lee, J. White. Dentin ablation with three infrared lasers. *Lasers Surg Med*, 1996; 18: 121–128.

221. Nevins, M., M. L. Nevins, A. Yamamoto, T. Yoshino, Y. Ono, C. Wang, D. Kim. Use of Er:YAG laser to decontaminate infected dental implant surface in preparation for reestablishment of bone-to-implant contact. *The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry*, 2014; 34 (4): 461–466.

222. Niemz, M. H., L. Eisenman, T. Pioch. Vergleich von drei Lasersystemen zur Abtragung von Zahnschmelz. *Schweiz Monatsschr Zahnmed*, 1993; 103 (10): 1252–1256.

223. *Nikawa, H., H. Yamashiro, S. Makihira et al.* In vitro cariogenic potential of *Candida albicans*. *Mycoses*, 2003; 46: 471–478.

224. *Odor, T. M., T. F. Watson, T. R. Pitt Ford, F. McDonald.* Pattern of transmission of laser light in teeth. *International Endodontic Journal*, 1996; 29: 228–234.

225. *Oelgiesser, D., J. Blasbalg, A. Ben-Amer.* Cavity preparation by Er:YAG laser on pulpal temperature rise. *Am J Dent*, 2003; 16 (April): 96–98.

226. *Okamoto, H., T. Iwase, T. Morioka.* Dye-mediated bactericidal effect of He-Ne laser irradiation on oral microorganisms. *Lasers Surg. Med.*, 1992; 12: 450–458.

227. *Oskoe, S., P. A. Oskoe, E. J. Navimipour, A. A. Ajami, F. P. Azar, S. Rikhtegaran, M. Amini.* Comparison of the effect of Nd:YAG and diode lasers and photodynamic therapy on microleakage of class V composite resin restorations. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospect*, 2013; 7 (2): 74–80.

228. *Paardekooper, M., A. W. Bruijne, J. Van Steveninck, P. J. Van Den Broek.* Intracellular damage in yeast cells caused by photodynamic treatment. with toluidine blue. *Photochem. Photobiol.*, 1995; 61: 84–89.

229. *Paghdiwala, A., T. Vaidyanathan, M. Paghdiwala.* Evaluation of Erbium:YAG laser radiation of hard dental tissues: Analysis of temperature changes, depth of cuts and structural effects. *Scanning Microsc*, 1993; 7: 989–997.

230. *Pagonis, T. C., J. Chen, C. R. Fontana, H. Devalapally, K. Ruggiero, X. Song, F. Foschi, J. Dunham, Z. Skobe, H. Yamazaki, R. Kent, A. C. R. Tanner, M. M. Amiji, N. S. Soukos.* Nanoparticle-based endodontic antimicrobial photodynamic therapy. *Journal of Endodontics*, 2010; 36 (2): 322–328.

231. *Pandurić, Dr. G., I. Bago, D. Katanec, J. Žabkar, I. Miletić, I. Anić.* Comparison of Er:YAG laser and surgical drill for osteotomy in oral surgery: An experimental study. *Journal of Oral & Maxillofacial Surgery*, 2012; 70 (11): 2515–2521.

232. *Paterson, R. C., F. M. Paterson.* Pulp capping. *International Endodontic Journal*, 1971; 5 (1): 7–9.
233. *Paterson, R. C., S. K. Pountney.* The response of the dental pulp to mechanical exposure in gnotobiotic rats mono-infected with a strain of *Streptococcus mutans*. *International Endodontic Journal*, 1987; 20 (4): 159–168.
234. *Paulino, T. P., K. F. Ribeiro, G. Thedei, A. C. Tedesco, P. Ciancaglini.* Use of hand held photopolymerizer to photoinactivate *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol*, 2005; 50: 353–359.
235. *Pegalli, J., C. Gimbel, R. Hansen, A. Swett, D. Winn.* Investigation study of the use of Er:YAG laser versus dental drill for caries removal and cavity preparation – phase I. *J Clin Laser Surg Med*, 1997; 15:109–115.
236. *Perhavec, T., M. Lukac, J. Diaci, M. Marincek.* Heat eposition of erbium lasers in hard dental tissues. *J Oral Laser Applications*, 2009; 9 (4): 205–212.
237. *Peters, D. D., R. A. Augsburger.* In vitro model to evaluate intrapulpal temperature changes. *Journal of Endodontics*, 1981; 7: 320–324.
238. *Petersen, P. E., D. Bourgeois, H. Ogawa, S. Estupinan-day, C. Ndiaye.* The global burden of oral diseases and risks to oral health. *Bull World Health Organ*, 2005; 83:661–669.
239. *Poggio, C., C. Arciola, A. Dagna, F. Florindi, M. Chiesa, E. Saino et al.* Photoactivated disinfection (PAD) in endodontics: an in vitro microbiological evaluation. *Int J Artif Organs*, 2011;34: 889–897.
240. *Powell, G. L.* Prevention of dental caries by laser irradiation: A review. *Journal of Oral Laser Applications*, 2006; 6 (4): 255–257.
241. *Pugach, M. K., J. Strother, C. L. Darling, D. Fried, S. A. Gansky, S. J. Marshall, G. W. Marshall.* Dentin Caries Zones: Mineral, Structure, and Properties. *J Dent Res.*, 2009; 88 (1): 71–76.
242. *Raab, O.* Ueber diwirkung fluoreszierender stoffe auf infusori. *Z. Biol.*, 1900; 39: 524–536.

243. *Rajesh, S., E. Koshi, P. Koshi, A. Mohan.* Antimicrobial photodynamic therapy: An overview. *Journal of Indian Society of Periodontology*, 2011; 15 (4): 323–327.

244. *Rechmann, P.* Dental laser research: selective ablation of caries, calculus, and microbial plaque. From the idea to the first in vivo investigation. *Dent Clin N Am*, 2004; 48: 1077–1104.

245. *Ribeiro, C. C., L. N. Baratieri, J. Perdigão, N. M. Baratieri, A. V. Ritter.* A clinical, radiographic, and scanning electron microscopic evaluation of adhesive restorations on carious dentin in primary teeth. *Quintessence Int.*, 1999; 30(9): 591–599.

246. *Roebuck, E. M., W. P. Saunders, C. J. Whitters.* Influence of Erbium:YAG laser energies on the microleakage of Class V resin-based composite restorations. *Am J Dent*, 2000; 13: 280–284.

247. *Rolim, J., M. de-Melo, S. Guedes, F. Albuquerque-Filho, J. Souza, N. Nogueira et al.* The antimicrobial activity of photodynamic therapy against *Streptococcus mutans* using different photosensitizers. *J Photochem Photobiol B.*, 2012; 106: 40–46.

248. *Romano, V., R. Rodriguez, H. Altermatt, M. Frenz, H. Weber.* Bone microsurgery with IR-Lasers: a comparative study of the thermal action at different wavelengths. *SPIE*, 2077: 87–97.

249. *Rosental, I.* Phthalocyanines as photodynamic sensitizers – yearly review. *Photochemistry and Photobiology*, 1991; 53 (6): 859–870.

250. *Salmeron, S., M. Rezende, A. Consolaro, A. Sant'Ana, C. A. Damante, S. L. A. Greggi, E. Passanezi.* Laser therapy as an effective method for implant surface decontamination: a histomorphometric study in rats. *Journal of Periodontology*, 2013; 84 (5): 641–649.

251. *Salva, K. A.* Photodynamic therapy: unapproved uses, dosages, or indications. *Clin Dermatol*, 2002; 20: 571–581.

252. *Samyuktha, V., R. Pabbati, N. Bolla, K. Ranganathan, T. Jayaprakash, S. Vemuri.* Cytotoxicity evaluation of root repair materials in human-cultured periodontal ligament fibroblasts. *Journal of Conservative Dentistry*, 2014; 17 (5): 467–470.

253. *Santini, A.* The management of the deep carious lesion and maintenance of pulp vitality (II). *Quintessence Int Dent Dig*, 1980; 11 (4): 17–23.
254. *Sarmadi, R., E. Hedman, P. Gabre.* Laser in caries treatment – patients’ experiences and opinions. *Int J Dent Hygiene*, 2014; 12: 67–73.
255. *Schnur, S.* The wound. 1: Diagnosis and clinical aspects. *MMW Fortschr Med.*, 2000; 142 (40): 43–4.
256. *Segalla, A., C. D. Borsarelli, S. E. Braslavsky, J. D. Spikes, G. Roncucci, D. Dei, G. Chiti, G. Jori, E. Reddi.* Photophysical, photochemical and antibacterial photosensitizing properties of a novel octacationic Zn (II) – phthalocyanine. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2002; 1: 641–648.
257. *Sekine, Y., A. Ebihara, A. Takeda, H. Suda.* Pulpal reaction in dog following cavity preparation by Er:YAG laser. *SRIE*, 1994: 159–167.
258. *Seltzer, S., I. Bender.* The dental pulp. Biologic considerations in dental procedures, 1975, ed 2. Philadelphia: J. B. Lippincott.
259. *Selwitz, R. H., A. L. Ismail, N. B. Pitts.* Dental caries. *Lancet*, 2007; 369: 51–59.
260. *Sharma, V., M. Nainan, V. Shivanna.* The effect of cavity disinfectants on the sealing ability of dentin bonding system: An *in vitro* study. *J Conserv Dent*, 2009; 12 (3): 109–113.
261. *Sharon-Buller, A., C. Block, I. Savion, M. Sela.* Reduced bacteria levels in cavities prepared by Er:YAG Laser. *J Oral Laser Applications*, 2003; 3 (3): 153–155.
262. *Shi, D., S. Feng, Y. Qiao, P. Wenc.* The research on temperature distribution of GaN-based blue laser diode. *Solid-State Electronics*, 2015; 109: 25–28.
263. *Shigetani, Y., H. Suzuki, H. Ohshima, K. Yoshiba, N. Yoshiba, T. Okiji.* Odontoblast response to cavity preparation with Er:YAG laser in rat molars: an immunohistochemical study. *Odontology*, 2013; 101: 186–192.
264. *Singh, A., A. Velu.* Histological changes in pulp after tooth preparation with high-speed handpieces and Er:YAG Laser: a light-microscopic analysis. *J Oral Laser Applications*, 2010; 10 (1): 37–44.

265. *Siqueira, J. F., H. P. Lopes.* Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. *Int. Endod. J.*, 1999; 32: 361–369.

266. *Soares, L., O. Martin, L. Moriyama, C. Kurachi, A. Martin.* Relationship between the chemical and morphological characteristics of human dentin after Er:YAG laser irradiation. *J Biomed Opt*, 2013; 18 (6): 068001.

267. *Soncin, M., C. Fabris, A. Buseti, D. Dei, D. Nistri, G. Roncucci, G. Jori.* Approaches to selectivity in the Zn (II)–phthalocyanine photosensitized inactivation of wild-type and antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus*. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2002; 1: 815–819.

268. *Sonntag, K., B. Kutzman, J. Burkes, J. Hoke, J. Moshonov.* Pulpal response to cavity preparation with the Er: YAG and Mark III free electron lasers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 1996; 81: 695–701.

269. *Soukos, N., J. Goodson.* Photodynamic therapy in the control of oral biofilms. *Periodontology*, 2000 2011; 55: 143–166.

270. *Soukos, N. S., M. Wilson, T. Burns, P. Speight.* Photodynamic effects of toluidine blue on human oral keratinocytes and fibroblasts and *Streptococcus sanguis* evaluated in vitro. *Lasers Surg Med*, 1996; 18: 253–259.

271. *Souza Costa De Carlos, A., J. Hebling, D. Scheffel, D. Soares, F. Basso, A. Ribeiro.* Methods to evaluate and strategies to improve the biocompatibility of dental materials and operative techniques. *Dental Materials*, 2014; 30 (7): 769–784.

272. *Spielmann, H. et al.* EEC/COLIPA project on in vitro phototoxicity testing: first results obtained with a BALB/C 3T3 Cell phototoxicity assay. *Toxic in vitro* 1994; 8 (4): 793–796.

273. *Spielmann, H. et al.* The international EU/COLIPA In vitro phototoxicity validation study: results of phase II (Blind Trial). Part 1: The 3T3 NRU phototoxicity test. *Toxicology in vitro*, 1998; 12 (3): 305–327.

274. *Stanley, H. R., C. H. Pameijer.* Dentistry's friend: calcium hydroxide. *Operative Dentistry* 1997; 22: 1–3.

275. *Strauss, R. A., S. D. Fallon.* Lasers in contemporary oral and maxillofacial surgery. *Dent Clin N Am*, 2004; 48: 771–794.

276. *Stuart, C., A. Schwartz, T. Beeson, C. Owatz.* Enterococcus faecalis: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *Journal of Endodontics*, 2006; 32: 93–98.

277. *Takahashi, P., H. J. Toups, D. B. Greenberg, G. T. Dimopoulos, L. L. Rusoff.* Irradiation of *Escherichia coli* in the visible spectrum with a tunable organic-dye laser energy source. *Appl. Microbiol*, 1975; 29: 63–67.

278. *Takamori, K.* A histopathological and immunohistochemical study of dental pulp and pulpal nerve fibers in rats after the cavity preparation using Er:YAG laser. *Journal of Endodontics*, 2000; 26 (2): 95–99.

279. *Takizawa, M.* A study on Er:YAG laser ablation for dental hard substance. *Jpn J Conserv Den*, 1996; 39:1089–1128.

280. *Tang, H., M. Hamblin, C. Yow.* A comparative in vitro photoinactivation study of clinical isolates of multidrug-resistant pathogens. *J Infect Chemother*, 2007; 13: 87–91.

281. *Tegos, G., M. Anbe, C. Yang, T. Demidova, M. Satti, P. Mroz, S. Janjua, F. Gad, M. Hamblin.* Protease-stable polycationic photosensitizer conjugates between polyethyleneimine and chlorin (e6) for broad-spectrum antimicrobial photoinactivation. *Antimicrob. Agents Chemother*, 2006; 50: 1402–1410.

282. *Todea, C., C. Kerezsi, C. Balabuc, M. Calniceanu, L. Filip.* Pulp capping – from conventional to laser-assisted Therapy (I). *Journal of Oral Laser Applications*, 2008; 8 (2): 71–82.

283. *Todea, C., C. Kerezsi, C. Balabuc, M. Calniceanu, L. Filip.* Pulp capping – from conventional to laser-assisted Therapy (II). *Journal of Oral Laser Applications*, 2008; 8 (3): 147–155.

284. *Torstenson, B.* Pulpal reaction to a dental adhesive in deep human cavities. *Endod Dent Traumatol*, 1995; 11: 172–176.

285. *Tuner, J., L. Hode.* The new laser therapy handbook. Prima books AB, 2010.

286. *Türkün, M., S. Türkün, A. Kalender.* Effect of cavity disinfectants on the sealing ability of nonrinsing dentin-bonding resins. *Quintessence International*, 2004; 35 (6): 469–476.

287. *Tziafas, D.* Basic mechanisms of cytodifferentiation and dentinogenesis during dental pulp repair. *Int. J. Dev. Biol.* 1995; 39: 181–290.

288. *Usacheva, M. N., M. C. Teichert, M. A. Biel.* Comparison of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against gram-positive and gram-negative microorganisms. *Lasers Surg Med*, 2001; 29: 165–173.

289. *Usacheva, M. N., M. C. Teichert, M. E. Biel.* The role of methylene blue and toluidine blue monomers and dimers in the photoinactivation of bacteria. *J Photochem Photobiol B.*, 2003; 71: 87–98.

290. *Vahabi, S., P. Fekrazad, S. Ayremlou, S. Taheri, R. Lizarelli, K. Kalhori.* Antimicrobial photodynamic therapy with two photosensitizers on two oral streptococci: an in vitro study. *Laser Phys* 2011; 21:2132–7.

291. *Vahabi, S., R. Fekrazad, S. Ayremlou, S. Taheri, N. Zangeneh.* The effect of antimicrobial photodynamic therapy with radachlorin and toluidine blue on *Streptococcus mutans*: an in vitro study. *Journal of Dentistry*, 2011; 8 (2): 48–54.

292. *Valdes-Aguiler, O., D. C. Neckers.* Aggregation phenomena in xanthene dyes. *Acc Chem Res*, 1989; 22: 171–172.

293. *Van Houte, J.* Role of microorganisms in caries etiology. *J Dent Res*, 1994; 73: 672–681.

294. *Van Meerbeek, B., J. de Munck, D. Mattar, K. van Landuyt, P. Lambrechts.* Microtensile bond strengths of an Etch&Rinse and Self-Etch adhesive to enamel and dentin as a function of surface treatment. *Operative Dentistry*, 2003; 28 (5): 647–660.

295. *Van der Sluis, L., E. Kidd, R. Gruythuisen, L. Peters.* Preventive endodontics – an argument for avoiding root canal treatment. *ENDO (Lond Engl)*, 2013; 7 (4): 259–274.

296. *Vaziri, S., A. Kangarlou, R. Shahbazi, A. Nazari Nasab, M. Naseri.* Comparison of the bactericidal efficacy of photodynamic therapy,

2.5% sodium hypochlorite, and 2% chlorhexidine against Enterococcal faecalis in root canals; an in vitro study. *Dent Res J*, 2012; 9: 613–618.

297. *Verheyena, L. P.* Laser applications in oral medicine and dentistry. *The Journal of Oral Laser Applications*, 2002; 2 (4): 239–248.

298. *Verma, S., S. Maheshwari, R. K. Singh, P. K. Chaudhari.* Laser in dentistry: An innovative tool in modern dental practice. *National Journal of Maxillofacial Surgery*, 2012; 3 (2): 124–132.

299. *Vihabi, S., R. Fekrazad, S. Ayremlou, S. Taheri, N. Zangeneh.* The effect of antimicrobial photodynamic therapy with radachlorin and toluidine blue on *Streptococcus mutans*: an in vitro study. *J Dent*, 2011; 8 (2): 48–54.

300. *Visuri, S. R. et al.* Shear strength of composite bonded to Er:YAG laser-prepared dentin. *J Dent Res*, 1996; 75: 599–605.

301. *Visuri, S., J. Walsh, H. Wigdor.* Erbium laser ablation of dental hard tissue: effect of water cooling. *Laser Surg Med*, 1996; 18: 294–300.

302. *Wainwright, M.* Photodynamic antimicrobial chemotherapy. *J Antimicrob Chemother*, 1998; 42: 13–28.

303. *Wainwright, M.* The use of dyes in modern biomedicine. *Biotech Histochem*, 2003; 78: 147–155.

304. *Wainwright, M., R. M. Giddens.* Phenothiazinium photosensitizers: choice in synthesis application. *Dyes Pigm*, 2003; 57: 245–257.

305. *Walsh, J. T., T. F. Deutsch.* Measurement of Er: YAG Laser ablation plume dynamics. *Appl. Phys. B.*, 1991; 52: 217–224.

306. *Weerakoon, A. T., I. A. Meyers, A. L. Symons, L. J. Walsh.* Pulpal heat changes with newly developed resin photopolymerisation systems. *Aust Endod J*, 2002; 28 (3): 108–111.

307. *White, J. M., M. C. Fagan, H. E. Goodis.* Intrapulpal temperatures during pulsed Nd:YAG laser treatment of dentin in vitro. *J Periodontol*, 1994; 65: 255–259.

308. *Whitters, C. J., T. W. Macfarlane, D. Mackenzie, H. Moseley, R. Strang.* The Bactericidal activity of pulsed Nd-YAG laser radiation in vitro. *Lasers in Medical Science*, 1994; 9: 297–303.

309. *Wigdor, H., E. Abt, S. Ashrafi, J.T. Walsh.* The effect of lasers on dental hard tissues. *J Am Dent Assos*, 1993; 124: 65–70.
310. *Williams, K.* Effectiveness of Er:YAG laser therapy in periodontal patients. *The Journal of Dental Hygiene*, 2008; 82 (4): 1–5.
311. *Williams, J. A., G. Pearson, M. Colles, M. Wilson.* The effect of variable energy input from a novel light source on the photoactivated bactericidal action of toluidine blue O on *Streptococcus mutans*. *Caries Res*, 2003; 37: 190–193.
312. *Wilson, M.* Lethal photosensitization of oral bacteria and its potential application in the photodynamic therapy of oral infections. *J Photochem Photobiol*, 2004; 3: 412–418.
313. *Wilson, M., T. Burns, J. Patterson.* Killing of *Streptococcus sanguis* in biofilms using a light-activated antimicrobial agent. *J Antimicrob Chemother*, 1996; 37: 377–381.
314. *Wilson, M., N. Mia.* Sensitisation of *Candida albicans* to killing by low-power laser light. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 1993; 22 (8): 354–357.
315. *Wilson, B. C., M. S. Patterson.* The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy. *Phys Med Biol*, 2008; 53: 61–109.
316. *Wilson, M., A. Pratten.* Lethal photosensitization of *Staphylococcus aureus* in vitro: effect of growth phase, serum, and pre-irradiation time. *Lasers Surg Med*, 1995; 16 (3): 272–276.
317. *Wilson, M., C. Yianni.* Killing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by low-power laser light. *J Med Microbiol*, 1999; 42: 62–66.
318. *Wood, S., D. Melcaft, D. Devine, C. Robinson.* Erythrosine is a potential photosensitizer for photodynamic therapy of oral plaque biofilms. *J Antimicrob Chemother*, 2006; 57: 680–684.
319. *Wood, S., B. Nattress, J. Kirkham et al.* An in vitro study of the use of photodynamic therapy for the treatment of natural oral plaque biofilms formed in vivo. *J Photochem Photobiol*, 1999; 50:1–7.

320. *Xhevdet, A., D. Stubljari, I. Kriznar, T. Jukic, M. Skvarc, P. Veranic et al.* The disinfecting efficacy of root canals with laser photodynamic therapy. *J Lasers Med Sci*, 2014; 5: 19–26.

321. *Yadlapati, M., L. C. Souza, S. Dorn, G. P. Garlet, A. Letra, R. M. Silva.* Deleterious effect of triple antibiotic paste on human periodontal ligament fibroblasts. *International Endodontic Journal*, 2014; 47 (8): 769–775.

322. *Yaneva, B., E. Firkova, E. Karaslavova, G. Romanos.* Bactericidal effects of using a fiber-less Er:YAG laser system for treatment of moderate chronic periodontitis: preliminary results. *Quintessence Int*, 2014; 45 (6): 489–497.

323. *Yao, N., C. Zhang, C. Chu.* Effectiveness of photoactivated disinfection (PAD) to kill *Enterococcus faecalis* in planktonic solution and in an infected tooth model. *Photomed Laser Surg*, 2012; 30: 699–704.

324. *Yildirim, C., E. Karaarslan, S. Ozsevik, Y. Zer, T. Sari, A. Usumez.* Antimicrobial efficiency of photodynamic therapy with different irradiation durations. *Eur J Dent*, 2013; 7: 469–473.

325. *Yin, R., T. Dai, P. Avci, A. Jorge, W. de Melo, D. Vecchio, Y. Y. Huang, A. Gupta, M. Hamblin.* Light based anti-infectives: ultraviolet C irradiation, photodynamic therapy, blue light, and beyond. *Current Opinion in Pharmacology*, 2013; 13: 731–762.

326. *Yoshino, T., A. Yamamoto, Y. Ono.* Innovative regeneration technology to solve peri-implantitis by Er:YAG Laser based on the microbiologic diagnosis: A case series. *The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry*, 2015; 35 (1): 67–73.

327. *Young, D. A., J. D. B. Featherstone.* Caries management by risk assessment. *Community Dent Oral Epidemiol*, 2013; 41: 1–12.

328. *Zach, L., G. Cohen.* Pulp response to externally applied heat. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 1965; 19(4): 515–530.

329. *Zanin, J. C., R. B. Goncalves, J. R. Brugnera, C. K. Hope, J. Pratten.* Susceptibility of *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic therapy: an in vitro study. *J Antimicrob Chemother*, 2005; 56: 324–330.

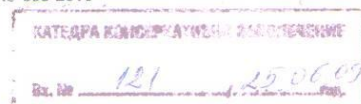
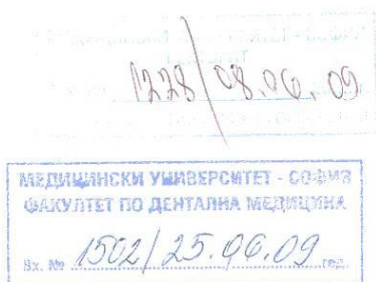
330. *Zanin, I., M. Lobo, L. Rodrigues, L. Pimenta, J. Höfling, R. Goncalves.* Photosensitization of in vitro biofilms by toluidine blue O combined with a light-emitting diode. *Eur J Oral Sci*, 2006; 114: 64–69.

# Х. ПРИЛОЖЕНИЯ

## Приложение 1

### МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ - СОФИЯ РЕКТОРАТ

София 1431, бул. „Акад. Ив. Евст. Гешов“ 15, тел. 952 3791, факс 953 2816



ДО  
ФАКУЛТЕТ ПО ДЕНТАЛНА МЕДИЦИНА  
КАТЕДРА ПО КОНСЕРВАТИВНО ЗЪБОЛЕЧЕНИЕ

ЗА ДОЦ. СЛАВЧО ДИМИТРОВ

ВОДЕЩ ИЗСЛЕДОВАТЕЛ НА ИЗСЛЕДОВАТЕЛСКИ  
ПРОЕКТ НА ТЕМА: *Нов метод за третиране на  
патогени на устната кухина с фотодинамично  
активни комплекси*

На основание Карта за експертна оценка, мотивирано становище и доклад на член на КЕНИМУС и въз основа на Решение взето с Протокол № 34 / 19.05.2009 г. Ви уведомяваме, че Проект № 3/2009(КЕНИМУС) е одобрен и научното изследване може да бъде проведено.

МОТИВ: Планираното изследване отговаря на националното и международно законодателство и етичните принципи за провеждане на научни изследвания.

ПРЕДСЕДАТЕЛ НА КЕНИМУС:  
(Проф. С.Попова)



ГБ/

**ДЕКЛАРАЦИЯ**  
**за информирано съгласие**

Подписаният/ната .....  
(трите имена)

ЕГН .....

**ДЕКЛАРИРАМ:**

**1.** Уведомен/а съм от д-р Доганджийска относно:

– Денталното ми здравословно състояние, диагнозата на зъба, който ще бъде лекуван и необходимостта от лечение.

– Целите и естеството на лечението, очакваните резултати и прогноза.

– Потенциалните рискове, свързани с предлаганите диагностично-лечебни методи, терапевтичните алтернативи, страничните ефекти, нежеланите лекарствени и други реакции, болка и други неудобства.

**2.** Информирани съм, че от лекуваните зъби (кавитети) ще бъдат взети проби за микробиологично изследване.

**3.** Запознат/а съм и приемам изцяло и напълно предложението ми за лечение и сроковете, в които ще се осъществи.

**4.** Информирани съм, че никакви лични данни, предоставени от мен на д-р Доганджийска, няма да бъдат използвани в публикации, които ще са резултат от това изследване.

Дата ..... г.

Декларатор: .....  
(подпис)

## Кратки биографични данни



Д-р Виолета Димитрова Доганджийска е родена на 08 януари 1978 година в град Дупница.

– 2002 г. – висше образование, магистър по дентална медицина – ФДМ, МУ – София.

– 2004 г.– редовен асистент в Катедра „Консервативно зъболечение“, ФДМ, МУ – София.

– 2006 г.– придобита специалност „Оперативно зъболечение и ендодонтия“.

– 2007 г. – придобита специалност „Обща стоматология“.

– 2007 г. – старши асистент в Катедра „Консервативно зъболечение“, ФДМ, МУ – София.

– 2011 г. – главен асистент в Катедра „Консервативно зъболечение“, ФДМ, МУ – София.

– 2015 г. – асистент в Катедра „Консервативно зъболечение“, ФДМ, МУ – София.

Участвала е в пет научни проекта – два, финансирани от фонд „Научни изследвания“ на МОН, и три, финансирани от Съвета по медицинска наука, МУ – София. Има публикации в научни специализирани списания и участия на български и международни научни форуми.

Член е на БЗС и БНСД.