Kliniczna i mikrobiologiczna analiza niechirurgicznego leczenia zapalenia przyzębia ze wspomagającym wykorzystaniem terapii fotodynamicznej – badania wstępne

Analysis of clinical and microbiological results of photodynamic therapy as support in non-surgical treatment of *periodontitis* – preliminary study

Adrian Maj¹, Aida Kusiak¹, Katarzyna Garbacz², Marta Ziółkowska-Klinkosz²

¹Katedra i Zakład Periodontologii i Chorób Błony Śluzowej Jamy Ustnej GUMed

²Zakład Mikrobiologii Jamy Ustnej GUMed

Terapia fotodynamiczna stanowi wspomagającą metodę niechirurgicznego leczenia zapaleń przyzębia. Celem pracy była ocena wpływu zastosowania terapii fotodynamicznej na parametry kliniczne przyzębia ze szczególnym uwzględnieniem aspektu mikrobiologicznego w trakcie leczenia periodontologicznego. Przeprowadzone badania wykazały poprawę kliniczną stanu przyzębia u 6 na 7 pacjentów biorących udział w badaniu. Eliminację stanu zapalnego uzyskano u 85,7% badanych. Niechirurgiczne leczenie zapalenia przyzębia w połączeniu ze wspomagającym działaniem terapii fotodynamicznej przynosi obiecujące efekty terapeutyczne poprzez ograniczenie stanu zapalnego i spłylenie głębokości kieszonek przyzębnych.

Słowa kluczowe: terapia fotodynamiczna, leczenie niechirurgiczne, zapalenie przyzębia.

ABSTRACT

Introduction. Photodynamic therapy is supportive method of non-surgical treatment of *periodontitis*. The aim of the study was the assessment of photodynamic therapy impact on periodontal disease clinical parameters with a particular emphasis on microbiological aspects during periodontal treatment.

Material and methods. The research was conducted on seven healthy patients aged 26-55 years. All the patients were treated with a non-surgical (SRP) periodontal treatment. Then, the assisted photodynamic therapy was applied in selected pockets. Samples of the material obtained from periodontal pockets before and after the treatment were cultured in a microbiological laboratory.

Results. After the introduced therapy the clinical improvement of periodontal disease was observed in the majority (6/7) of patients taking part in the study. There obtained the elimination of inflammation to 85.7% of the patients. Periodontal pocket depths have deteriorated from 0.5

to 3.0 mm in comparison to the pre-treatment values. The overall number of bacteria compared to the pre-treatment value was reduced. In addition, there was noticed a decrease in the number of periopathogens. Control samples showed a vivid dominance of the physiological flora.

Conclusions. The non-surgical treatment of periodontitis in combination with the supportive action of photodynamic therapy has promising therapeutic effects by reducing the inflammation and decreasing the depth of periodontal pockets. The change in the ratio of periopathogens to physiological flora may indicate the restoration and maintenance of the state balance in periodontal pockets for patients with periodontitis.

Keywords: photodynamic therapy, non-surgical treatment, periodontitis.

WSTĘP

Jedną z najczęstszych przyczyn utraty uzębienia są choroby przyzębia. Ich etiopatogeneza jest złożona. Głównym rolę odgrywa zachwianie równowagi pomiędzy drobnoustrojami płytki nazębnej a mechanizmami obronnymi gospodarza, które są modyfikowane przez czynniki ryzyka.

Obecnie w niechirurgicznej terapii zapalenia przyzębia, poza mechaniczną i chemiczną eliminacją periopatogenów (bakterie kompleksu czerwonego – *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* i *Tanarella forsythia* oraz zielonego *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*), wciąż poszukuje się wspomagających metod leczenia tej jednostki chorobowej (20,23). Jedną z nich jest miejscowa terapia fotodynamiczna, stosowana od niedawna w odniesieniu do przyzębia, stanowiąca element wspomagający klasyczne leczenie. W metodzie tej wykorzystuje się zjawisko wzbudzania fotouczulacza (najczęściej błękit toluidyny) przez falę świetlną dostosowaną do jego widma absorpcyjnego, w wyniku czego dochodzi do powstawania reaktywnych form tlenu (tlenu singletowego wraz z rodnikami: ponadtlennokowymi; hydroksylowymi i wodoronadtlenkowymi), które niszczą błony komórkowe bakterii (16,4,8).

Źródłami światła w terapii fotodynamicznej mogą być niskoenergetyczne lasery i lampy LED, które powodują mniejszą generację ciepła i lepszą penetrację światła (co ma szczególne istotne znaczenie przy bakteriiach takich jak *Porphyromonas gingivalis* i *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*). Mającym częste zastosowanie fotosensibilizatorom o strukturze kationowej jest chlorek toluidyny (tzw. błękit toluidyny) należący do barwników tiazynowych. Maksimum absorpcji błękitu toluidynowego mieści się w zakresie długości fali światła widzialnego o barwie czerwonej wynoszącej 630 nm (6,17,14,21,22,9).

Celem pracy była ocena wpływu zastosowania terapii fotodynamicznej na parametry kliniczne przyzębia ze szczególnym uwzględnieniem aspektu mikrobiologicznego w trakcie leczenia periodontologicznego.

MATERIAŁ I METODY

W badaniu klinicznym brało udział 7 ogólnie zdrowych, niepalących osób (3 mężczyzn, 4 kobiety) w wieku 26-55 lat (śr= 36,9; SD= 10,8) z dobrą higieną jamy ustnej z zapaleniem przyzębia z obecnością kieszonek przyzębnych PD $\geq$ 5 mm. Badane osoby w ciągu ostatnich

3 miesiące nie przyjmowały antybiotyków i nie były poddawane zabiegowi usunięcia złogów nazębnych. Z badania zostali wyłączeni pacjenci z zaawansowanym zapaleniem przyzębia (duże ubytki poziome kości, bez obecności kieszonek przyzębnych). Wszystkich pacjentów przed i po leczeniu poddano badaniu periodontologicznemu i mikrobiologicznemu (pomiar stanu higieny wskaźnikiem API, stanu przyzębia wskaźnikami mSBI i BOP, głębokości kieszonek przyzębnych PD oraz pobranie materiału z kieszonek za pomocą jałowych sączków). Następnie przeprowadzono standardowe leczenie niechirurgiczne (skaling i root planning- SRP) z użyciem narzędzi ultradźwiękowych EMS dental i ręcznych kiret Gracey Hu-Friedy. W ciągu tygodnia wybrane kieszonki przyzębne zostały poddane terapii fotodynamicznej za pomocą lampy FotoSan 630 CMS Dental z końcówką perio oraz fotouczulacza FotoSan agent CMS Dental o średniej gęstości. Zastosowana w badaniach procedura terapii fotodynamicznej: przed aplikacją preparatu o działaniu fotouczulającym, kieszonkę przyzębną dokładnie przepłukano 0,9% roztworem NaCl. Za pomocą strzykawki i igły z bocznym otworem zaaplikowano do jej wnętrza 0,2 ml fotouczulacza i pozostawiono na okres 3 minut. Następnie kieszonkę ponownie obficie przepłukano roztworem soli fizjologicznej celem wypłukania niezwiązanego preparatu. Przy pomocy lampy FotoSan 630 aktywowano fotouczulacz poprzez wprowadzenie do kieszonki jednorazowej końcówki perio oraz naświetlaniu przez 20 sekund na jedną powierzchnię korzenia. Po zakończonym zabiegu kieszonkę przepłukano roztworem soli fizjologicznej. Powyższą procedurę powtarzano 3 razy w ciągu 7 dni.

Zastosowana w badaniach procedura oceny mikrobiologicznej: materiał do badań pobierano za pomocą jałowych sączków, każdy z nich umieszczano na 2 minuty w kieszonce przyzębnej, a następnie niezwłocznie w aseptyczny sposób przenoszono do bulionu tioglikolanowego. Materiał dostarczano do laboratorium w temperaturze pokojowej maksymalnie po 2 godzinach od pobrania. Wykonywano seryjne rozcieńczenia próbek w bulionie Schaedlera, które niezwłocznie posiewano na podłoża stałe wzbogacone i wybiórcze do hodowli bakterii beztlenowych: Schaedler agar z 5% krwią i witaminą K3, Schaedler CNA agar z 5% krwią, Schaedler kanamycyną i vancomycyną - agar z 5% krwią, Schaedler z neomycyną i vancomycyną - agar z 5% krwią. Płytki inkubowano przez 10 dni w temperaturze 37°C w anaerostatach wypełnionych mieszaniną gazów: 10% CO₂, 10% H₂ i 80% N₂ w obecności katalizatora palladowego i wskaźnika warunków beztlenowych. Wyhodowane szczepy bakterii beztlenowych identyfikowano przy użyciu spektrometrii masowej MALDI Biotyper firmy Bruker Daltonik GmbH. Niewielką ilość wyhodowanego materiału nanoszono na metalową płytkę, którą pozostawiano do wyschnięcia w temperaturze pokojowej. Następnie, na płytkę, nakładano 70% kwas mrówkowy, a po wyschnięciu 1 µl roztworu matrycy i ponownie pozostawiano do wyschnięcia w temperaturze pokojowej. Płytkę umieszczano w komorze pomiarowej aparatu MALDI Biotyper. Usuowano powietrze w celu uzyskania próżni i poddawano działaniu promienia laserowego. Następową desorpcją i jonizacją białek bakteryjnych. Zjonizowane peptydy przyspieszono w silnym polu elektrycznym i mierzono czas ich przelotu (time of flight). System MALDI-TOF MS automatycznie generował spektrometryczne widma pików odpowiadających jonom o różnym stosunku masy do ładunku na podstawie rozkładu peptydów według masy cząsteczkowej, ładunku, oraz zróżnicowanego czasu przelotu. Ponadto analizował ilość, intensywność i korelację plików. Badane widmo było porównywane z widmami referencyjnymi drobnoustrojów.

Badania zostały zatwierdzone przez Niezależną Komisję Bioetyczną ds. Badań Naukowych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (NKBBN/508/2016). Wszelkie etyczne aspekty projektu były zgodne z Deklaracją Helsińską.

WYNIKI

Po zastosowanej terapii zaobserwowano poprawę kliniczną stanu przyzębia u zdecydowanej większości (6/7) pacjentów biorących udział w badaniu. Eliminację stanu zapalnego wyrażoną poprzez zmniejszenie wskaźnika krwawienia po zgłębnikowaniu (BOP) uzyskano u 85,7% badanych. U tych osób znaczącej poprawie uległa również głębokość sondowania (PD). Uzyskano spłylenie głębokości kieszonek przyzębnych od 0,5 do 3,0 mm ($\bar{x}$ =1,36 mm; SD= 1,14) w stosunku do wartości przed leczeniem (Tabela I).

Tabela I. Ocena parametrów klinicznych stanu przyzębia.

Nr PACJENTA	PŁEĆ	WIEK	ZĄB	PRZED LECZENIEM		PO LECZENIU	
				PD	BOP	PD	BOP
1	M	26	16	5,0	+	4,5	-
2	M	55	16	13,0	+	10,0	-
3	K	28	46	5,0	+	4,5	-
4	K	34	46	5,0	+	3,5	-
5	K	47	17	5,5	-	3,5	-
6	M	39	26	7,0	+	7,0	+
7	K	29	26	6,0	+	5,0	-

Poprawę stanu klinicznego przyzębia potwierdziły wyniki badania mikrobiologicznego. Ogólna liczba wszystkich bakterii w stosunku do wartości przed leczeniem uległa zmniejszeniu o 1-2 rzędy wielkości (do wartości 10^6 - 10^7 /ml). Ponadto, w próbkach pobranych po leczeniu odnotowano zmniejszenie liczby periopatogenów oraz dominację paciorkowców zieleniejących należących do flory fizjologicznej (Tabela II).

Tabela II. Ocena stanu mikrobiomu kieszonek przyzębnych.

Nr PACJENTA	PRZED LECZENIEM	PO LECZENIU	
	LICZBA BAKTERII/ML	LICZBA BAKTERII/ML	BAKTERIE DOMINUJĄCE
1	$1,2 \cdot 10^7$	$3,8 \cdot 10^6$	<i>S. oralis</i> <i>S. sanguis</i>
2	$8,8 \cdot 10^8$	$3,1 \cdot 10^7$	<i>S. intermedius</i> <i>S. mitis</i> <i>S. anginosus</i> <i>S. constellatus</i>
3	$1,5 \cdot 10^7$	$1,0 \cdot 10^6$	<i>S. cristatus</i> <i>S. oralis</i>
4	$3,4 \cdot 10^8$	$5,0 \cdot 10^6$	<i>S. gordonii</i> <i>S. intermedius</i>
5	$1,8 \cdot 10^7$	$4,6 \cdot 10^6$	<i>S. constellatus</i> <i>S. oralis</i>
6	$4,6 \cdot 10^7$	$1,2 \cdot 10^6$	<i>S. intermedius</i> <i>S. mitis</i> <i>S. oralis</i>
7	$2,2 \cdot 10^8$	$7,5 \cdot 10^6$	<i>S. oralis</i> <i>S. gordonii</i> <i>S. mitis</i>

DYSKUSJA

Liczba doniesień naukowych dotyczących terapii fotodynamicznej w skojarzonej terapii zapaleń przyzębia jest stosunkowo mała. Przedstawiają one często odmienną metodykę badań i uzyskane rezultaty. Poprawę stanu klinicznego przyzębia poprzez zmniejszenie głębokości kieszonek przyzębnych oraz „uzysk” poziomu przyczepu łącznotkankowego po zastosowanej terapii będącą potwierdzeniem wyników badań własnych otrzymali w swoich pracach *Goh* i wsp oraz *Moreira* i wsp. (7, 13). Wyższą skuteczność leczenia niechirurgicznego z zastosowaniem terapii fotodynamicznej wyrażoną poprzez ograniczenie stanu zapalnego i spłylenie głębokości kieszonek przyzębnych uzyskali również *Andersen* i wsp., *Betsy* i wsp., *Braun* i wsp oraz *Krajewski* i wsp (1, 2, 3, 10). *Christodoulides* i wsp. (5) oraz *Polansky* i wsp. (15) uzyskali ograniczenie stanu zapalnego wyrażone wskaźnikami FMBS i BOP na korzyść zastosowanej wspomagającej terapii fotodynamicznej bez różnic w pozostałych parametrach klinicznych (5,15). Ponadto poprawę warunków mikrobiologicznych wyrażoną m.in. zmniejszeniem liczby bakterii należących do kompleksu czerwonego zanotowali *Sgolastra* i wsp. (18) oraz *Mongardini* i wsp. (12) zaś spadek poziomu *Fusobacterium nucleatum* odnotowali *Sigusch* i wsp. (19).

W badanym materiale własnym pobranym z kieszonek przyzębnych przed leczeniem nie można jednoznacznie wskazać gatunku dominującego. Zanotowano tu występowanie zarówno gatunków oportunistycznych, patogennych (beztlenowe pałeczki gram-ujemne), jak i takich, które należą do fizjologicznej flory szczeliny dziąsłowej.

W materiale własnym pobranym po leczeniu pomimo obecności gatunków bakterii uznanych za patogenne stwierdzono wyraźną dominację paciorkowców zieleniejących. Potwierdzają to badania *Marsha* i wsp. (11) gdzie paciorkowce stanowią 29% mikroflory zasiedlającej szczelinę dziąsłową. Często notowano również obecność pałeczek Gram-dodatnich z rodzajów *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*. Taki wynik badania świadczy prawdopodobnie o powrocie mikrobiomu kieszonki przyzębnej do stanu równowagi. Biorąc pod uwagę analizę własnego materiału mikrobiologicznego wyhodowanego przed zastosowaniem leczenia i po jego zakończeniu należy stwierdzić, że ocena zmian spektrum mikrobiologicznego kieszonki przyzębnej nie powinna opierać się jedynie na stwierdzeniu obecności lub braku gatunków patogennych, ale na ich wzajemnych proporcjach w badanym materiale klinicznym.

WNIOSKI

1. Niechirurgiczne leczenie zapalenia przyzębia w połączeniu ze wspomagającym działaniem terapii fotodynamicznej przynosi obiecujące efekty terapeutyczne poprzez ograniczenie stanu zapalnego i spłylenie głębokości kieszonek przyzębnych.
2. Zmiana stosunku periopatogenów do flory fizjologicznej może świadczyć o przywróceniu stanu równowagi mikrobiomu kieszonek przyzębnych u osób z zapaleniem przyzębia.

PIŚMIENICTWO

1. *Andersen R, Loebel N, Hammond D, Wilson M.* Treatment of Periodontal Disease by Photodisinfection Compared to Scaling and Root Planing. J Clin Dent 2007; 18, 2: 1-5.

2. Betsy J, Prasanth CS, Baiju KV i inni. Efficacy of antimicrobial photodynamic therapy in the management of chronic periodontitis: a randomized controlled clinical trial. *J Clin Periodontol* 2014; 41: 573-81.
3. Braun A, Dehn C, Krause F, Jepsen S. Short-term clinical effects of adjunctive antimicrobial photodynamic therapy in periodontal treatment: a randomized clinical trial. *J Clin Periodontol* 2008; 35: 877-84.
4. Choromańska A, Kulbacka J, Saczko J. Terapia fotodynamiczna – założenia, mechanizm, aplikacje kliniczne. *Nowa Medycyna* 2013; 1: 26-30.
5. Christodoulides N, Nikolidakis D, Chondros P i inni. Photodynamic therapy as an adjunct to non-surgical periodontal treatment: a randomized, controlled clinical trial. *J Periodontol* 2008; 79: 1638-44.
6. Dembowska E, Samulak-Zielińska R. Lasery w stomatologii. *Laserowa fototerapia w stomatologii*. Czelej, Lublin 2015; s. 343-63.
7. Goh EX, Tan KS, Chan YH, Lim LP. Effects of root debridement and adjunctive photodynamic therapy in residual pockets of patients on supportive periodontal therapy: A randomized split-mouth trial. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2017; 18: 342-8.
8. Gośliński T, Konopka K, Piskorz J i inni. Perspektywy zastosowania fotodynamicznej terapii skierowanej przeciw mikroorganizmom – PACT. *Post. Mikrobiol* 2008; 47: 447-56.
9. Kikuchi T, Mogi M, Okabe I i inni. Adjunctive Application of Antimicrobial Photodynamic Therapy in Nonsurgical Periodontal Treatment: A Review of Literature. *Int J Mol Sci* 2015; 16: 24111-26.
10. Krajewski J, Siemiątkowski M. Ocena wpływu stosowania terapii fotodynamicznej za pomocą urządzenia FotoSan na parametry kliniczne stanu tkanek przyzębia. *Twój Przegląd Stomatologiczny* 2010; 9: 59-62.
11. Marsh P.D, Martin M.V. *Mikrobiologia Jamy Ustnej*. Stała mikroflora zasiedlająca jamę ustną. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1994; s. 40-65.
12. Mongardini C, Di Tanna GL, Piloni A. Light-activated disinfection using a light-emitting diode lamp in the red spectrum: clinical and microbiological short-term findings on periodontitis patients in maintenance. A randomized controlled split-mouth clinical trial. *Lasers Med Sci* 2014; 29: 1-8.
13. Moreira AL, Novaes AB Jr, Grisi MF i inni. Antimicrobial photodynamic therapy as an adjunct to non-surgical treatment of aggressive periodontitis: a split-mouth randomized controlled trial. *J Periodontol* 2015; 86: 376-86.
14. Oruba Z, Chomyszyn-Gajewska M. Zastosowanie terapii fotodynamicznej w stomatologii - przegląd piśmiennictwa. *Przegląd Lekarski* 2016, 73, 11: 57-861.
15. Polansky R, Haas M, Heschl A, Wimmer G. Clinical effectiveness of photodynamic therapy in the treatment of periodontitis. *J Clin Periodontol* 2009; 36: 575-80.
16. Rutkowski R, Panciewicz S, Rutkowski K, Rutkowska J. Znaczenie reaktywnych form tlenu i azotu w patomechanizmie procesu zapalnego. *Pol Merk Lek* 2007; 23: 131-4.
17. Samulak – Zielińska R, Dembowska E. Zastosowanie terapii fotodynamicznej w leczeniu zapaleń przyzębia – przegląd piśmiennictwa. *Dent Med Probl* 2010; 47, 2: 221-9.
18. Sgolastra F, Petrucci A, Gatto R i inni. Photodynamic therapy in the treatment of chronic periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *Lasers Med Sci* 2013; 28: 669-82.

19. *Sigusch BW, Engelbrecht M, Volpel A* i inni. Full-mouth antimicrobial photodynamic therapy in *Fusobacterium nucleatum*-infected periodontitis patients. *J Periodontol* 2010; 81: 975-81.
20. *Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA* i inni. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 1998; 25: 134-44.
21. *Szulc M, Ziętek M*. Zastosowanie terapii fotodynamicznej w chorobach przyzębia – na podstawie piśmiennictwa. *Czas Stomatol* 2007; LX, 8: 527-35.
22. *Takasaki AA, Aoki A, Mizutani K* i inni. Application of antimicrobial photodynamic therapy in periodontal and peri - implant diseases. *Periodontology* 2000 2009; 51: 109 – 40.
23. *Ximenez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS*. Comparison of the microbiota of supra- and subgingival plaque in health and periodontitis. *J Clin Periodontol* 2000; 27: 648–57.

Otrzymano: 20 XII 2018 r.

Adres Autora: 80-204 Gdańsk, ul. Orzeszkowej 18, Katedra i Zakład Periodontologii i Chorób Błony Śluzowej Jamy Ustnej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

e-mail: akusiak@gumed.edu.pl; tel.+48 (58) 349-16-67