

Фотодинамическая терапия в лечении заболеваний периодонта (экспериментальное исследование)

Белорусский государственный медицинский университет

Антибактериальная фотодинамическая терапия – принципиально новый метод лечения инфекционно-воспалительных заболеваний. В статье представлены химико-биологические основы метода, история его развития и принципиальные отличия от традиционных противомикробных приемов. Собственное исследование включало получение экспериментальной модели периодонтита у крыс, проведение фотодинамического и низкоинтенсивного лазерного воздействия на пораженные ткани, сравнительную оценку полученных результатов с использованием клинических и микробиологических методов. В работе показана высокая клиническая эффективность (значительно выше, чем при лазерном воздействии) и бактерицидная активность ФД терапии: в 72,3% случаев поверхность обработанных тканей была полностью стерильна, в остальных случаях наблюдалось снижение уровня микробной обсемененности минимум на два порядка.

Ключевые слова: заболевания периодонта, фотодинамическая терапия, патогенные микроорганизмы, экспериментальный периодонтит, фотосенсибилизатор, лазерное излучение.

Лечение заболеваний периодонта продолжает оставаться одной из наиболее актуальных проблем современной стоматологии. Безуспешность применения традиционных средств и методов, а также высокая социальная значимость проблемы определяют необходимость поиска новых путей в ее решении. Согласно современным представлениям, периодонтологическое лечение базируется на следующих основных принципах: 1) микробная деконтаминация, которая включает мотивацию, удаление зубных отложений, а также местное и общее применение антимикробных средств; 2) перераспределение нагрузки между элементами зубного ряда и устранение травматической окклюзии, которое достигается путем шинирования, протезирования, пришлифовывания и др.; 3) мероприятия направленные на купирование воспаления, улучшение трофики и оксигенации тканей (физиотерапия, применение противовоспалительных препаратов, биостимуляторов и др.); 4) восстановительные вмешательства (гингиволастика, костнопластические операции и др.).

Первым и основополагающим звеном лечения заболеваний периодонта всегда является антимикробная терапия. Без непосредственного уничтожения патогенной микрофлоры зубодесневой борозды становятся неоправданными все последующие вмешательства, а неполная ее элиминация зачастую перечеркивает достигнутые результаты и ведет к рецидиву заболевания. На сегодняшний день существует большой арсенал средств, предназначенных

для механической и фармакологической деконтаминации тканей периодонта, однако, несмотря на практически полное удаление зубных отложений, обработку тканей мощными антисептиками и антибиотиками, с последующим использованием элементов комплексного лечения, добиться стойкой ремиссии, а тем более полного выздоровления удается далеко не всегда. Что же является причиной того, что, несмотря на все усилия врача и пациента, хронический процесс продолжает прогрессировать, а количество патогенной флоры неизменно возвращается к исходному уровню. Среди основных факторов, обуславливающих неудачи при проведении традиционного лечения, выделяют следующие:

1. Устойчивость микроорганизмов к действию антибиотиков. Возникновение микробной устойчивости обусловлено частым и нерациональным использованием антибактериальных препаратов при лечении различных заболеваний, а также высоким приспособительным потенциалом самих периодонтопатогенных штаммов. Кроме того, доказано, что применение некоторых антибиотиков (например, метициллина) способствует развитию перекрестной устойчивости к антисептикам и триклозану [11].

2. Недостаточная концентрация антибактериальных препаратов в десневой жидкости и микробной биопленке, которая зачастую оказывается ниже минимальной ингибирующей концентрации (МИС) микроорганизма-мишени. Ситуация осложняется тем, что матрица микробной биопленки формирует экологическое убежище, которое эффективно защищает бактериальные клетки от действия антибиотиков. Так, для достижения эффективности антибиотика в биопленке сравнимой с таковой в условиях питательной среды, может потребоваться увеличение концентрации препарата в 1500 раз [12].

3. Некоторые микроорганизмы локализуются в мягких тканях, что исключает их элиминацию путем механического воздействия или антисептической обработки. В последующем именно они служат причиной быстрой реколонизации поверхности зуба [13].

4. Рост числа пациентов с иммунодефицитными состояниями. В условиях недостаточности защитных сил организма, даже самая современная противомикробная терапия не даст желаемого эффекта.

Выходом из сложившейся ситуации могут стать принципиально новые пути воздействия на хронический воспалительный процесс в периодонте, и одним из таковых является фотодинамическая терапия – вмешательство, основанное на использовании деструктивного эффекта энергии фотохимических реакций. Антибактериальный компонент фотодинамической терапии не имеет ничего общего с механизмом действия антибиотиков или антисептиков, а используемое во время процедуры лазерное излучение, совершенно не преследует физиотерапевтических целей. До недавнего времени основной областью применения фотодинамической терапии была онкологическая практика, и лишь недавно была доказана возможность использования этого вида воздействия для лечения воспалительных заболеваний.

Механизм ФДТ

Для запуска фотодинамической реакции необходимы два основных компонента: вещество-фотосенсибилизатор и свет. Фотосенсибилизатором является химическое соединение, молекула которого под действием света видимой части спектра способна переходить в возбужденное (триплетное) состояние а, при возврате в основное, передавать полученную энергию другим соединениям. В роли акцептора энергии выступает кислород, который всегда присутствует в биологических тканях и который под действием фотосенсибилизатора переходит в так называемую синглетную форму – чрезвычайно активное соединение, обладающее выраженным повреждающим действием на клетку. Взаимодействуя с белками и другими макромолекулами, синглетный кислород запускает каскад свободнорадикальных реакций, в результате которых повреждаются биологические структуры, развиваются некротические и апоптотические изменения. Ключевым фактором является способность фотосенсибилизатора избирательно накапливаться в энергодефицитных клетках (опухолевых, микробных, поврежденных), что обуславливает возможность использования фотодинамической реакции для их уничтожения.

Известно более 400 веществ, обладающих фотосенсибилизирующим действием. Среди них такие соединения, как хлорофилл, эритрозин, флюорисцин, рибофлавин и другие. При производстве медицинских препаратов наибольшее распространение получили производные гематопорфирина, хлорина, фталоцианина, 5-аминолевуленовой кислоты. Одним из весьма перспективных и клинически востребованных фотосенсибилизаторов является соединение, относящееся к классу тетрапиррольных макроциклов хлоринового ряда, химическое производное хлорофилла а-хлорин еб. Среди стран СНГ, Россия долгое время оставалась единственной, освоившей выпуск препаратов на основе этого соединения (примерами российских хлоринсодержащих фотосенсибилизаторов являются «Радахлорин» и «Фотодитиазин»). Несколько лет назад в Республике Беларусь, на РУП «Белмедпрепараты» был также разработан и внедрен в производство свой фотосенсибилизатор на основе хлорина еб-препарат «Фотолон». Сегодня налажен выпуск препарата в виде порошка для приготовления инъекционного раствора, и гелевой формы для местного применения. Последняя была использована нами в качестве фотосенсибилизатора в нашей работе.

Попадая в организм и связываясь с клеткой-мишенью, сам по себе фотосенсибилизатор никакого действия не оказывает. Для запуска фотохимической реакции необходим свет. Фотосенсибилизаторы способны поглощать излучение всей видимой области спектра, но интенсивность реакции многократно усиливается при облучении светом с длиной волны, попадающей в строго определенный, очень узкий диапазон. Этот диапазон является специфичным для каждого вещества и носит название пик поглощения. Так для препаратов группы хлорина он составляет 654-670 нм, достигая максимума при длине волны 662 нм. Поскольку клиническое применение фотодинамического эффекта требует монохроматичности,

достаточной мощности излучения, а также возможности строгого дозирования и точной локализации световой энергии, в качестве излучателя целесообразно выбрать лазер. Кроме того, большое значение имеет способность лазерного излучения проникать вглубь ткани. В своей работе мы использовали аппарат лазерный терапевтический «Родник-1», разработанный сотрудниками Института физики НАН Беларуси.

История применения фотодинамической терапии

Энергия фотохимических реакций с глубокой древности использовалась людьми в терапевтических целях. Пробразом современных методов можно считать попытки древних египтян использовать светочувствительные вещества, содержащиеся в растениях, для лечения заболеваний кожи. Так порядка 6 тысяч лет назад для лечения витилиго (депигментация кожи) врачи применяли порошок, приготовленный из листьев зверобоя и петрушки, который наносился на пораженные участки кожи и длительно активировался солнечным светом. Процедура приводила к появлению пигментации по типу загара. Уже в XIII веке, в арабских странах для лечения той же патологии использовалась тинктура из меда и порошка семян растения эйтриллал (Aatrillal), которое в изобилии произрастало в долине реки Нил. Позже эйтриллал был идентифицирован как растение *Ammi majus* (амми большая, или китайский тмин), а лечебный эффект при его применении, как было показано, обуславливался наличием фурукумаринов (псораленов), обладающих выраженным фотосенсибилизирующим действием. Фотодинамическая реакция, которая развивалась в лейкодерме при его применении, приводила к везикуляции, сопровождающейся реэпителизацией и репигментацией. В наши дни из амми получен препарат аммифурин, который применяют при витилиго, псориазе, красном плоском лишае, нейродермите [3].

Намного позже, в 1887 году студентом фармакологического института Мюнхенского университета O.Raab, было описано уникальное явление: микроорганизмы (парамеции), помещенные в раствор акридинового оранжевого, и свободно перемещающиеся в темноте, гибнут на солнечном свете [6]. После ряда исследований, проведенных под руководством директора института профессора H.Tarpeiner, было сделано предположение о том, что флюорисцирующие субстраты наподобие акридинового красителя трансформируют энергию света в активную химическую энергию (living chemical energy), которая и вызывает гибель микроорганизмов. Базируясь на новых знаниях по фотодинамике, в 1903 году H. Tarpeiner и H. Jesionek провели первый сеанс ФДТ больному раком кожи, используя в качестве фотосенсибилизатора краситель эозин. В 1905 году они описали первые результаты лечения 6 больных базально-клеточным раком кожи лица местным применением 1% раствора эозина и длительным облучением солнечным светом или искусственным излучением дуговой лампы [7]. Им удалось добиться полной резорбции очагов у 4 больных с длительностью безрецидивного периода в течение 1 года.

Следующим важным этапом в развитии фотодинамической терапии стало открытие нового фотосенсибилизатора – гематопорфирина, фотохимическая активность которого существенно превосходила все предшествующие аналоги. Через некоторое время было синтезировано его производное (ППП), обозначаемое в англоязычной литературе как HPD (Hematoporphyrine derivate), которое по эффективности оказалась в 2 раза выше исходного соединения.

Второе рождение метод пережил в связи с началом медицинского применения лазеров (первая половина 60-х годов). Обладая монохроматичностью лазерный свет позволял использовать оптимальную для данного фотосенсибилизатора длину волны, что многократно увеличивало интенсивность фотохимической реакции. Кроме того, появилась возможность индукции световых потоков высокой мощности, транспортировки излучения по волоконно-оптическим системам к различным органам и тканям организма, а также прицельного воздействия на пораженные, содержащие фотосенсибилизатор клетки. С тех пор началось интенсивное внедрение метода фотодинамической терапии в различные сферы клинической практики.

Лечение онкопатологии стало одним из первых направлений, включивших в свой арсенал фотодинамическое воздействие. Сегодня метод с успехом применяется для лечения доброкачественных и злокачественных новообразований любой локализации, но наибольшее распространение он получил при заболеваниях кожи, дыхательных путей, желудочно-кишечного тракта, мочевого пузыря. Особое значение фотодинамическая терапия приобрела при удалении опухолей, расположенных в труднодоступных для хирургического вмешательства областях (поджелудочная железа, большой дуоденальный сосочек, общий желчный проток, внутривенные протоки), а также местах, где операция приводит к грубым косметическим и функциональным дефектам (на губе, в полости рта, на веке, на ушных раковинах) [4].

Не так давно показания к применению ФДТ существенно расширились. Причиной тому послужило экспериментальное обоснование возможности использования энергии фотохимических реакций для воздействия на патогенную микрофлору инфекционного очага. Первые положительные результаты были получены при лечении гнойных ран, трофических язв [5] и синуситов [2]. Чуть позже была доказана возможность применения ФДТ для лечения язвенной болезни желудка, в этиопатогенезе которой, согласно современным представлениям, основная роль принадлежит микроорганизму *Helicobacter pylori* [1]. Сейчас фотодинамическая терапия с успехом применяется для лечения инфекционно-воспалительных процессов в оториноларингологии, гнойной хирургии, гинекологии, урологии, фтизиопульмонологии и других областях. Данных по применению ФДТ в стоматологии крайне мало. Учитывая, что в возникновении и развитии периодонтита инфекционный компонент имеет определяющее значение,

актуальность изучения аспектов фотодинамической терапии в этом приложении, на наш взгляд, не вызывает сомнений.

Преимущества антибактериальной фотодинамической терапии

Какие же преимущества имеет антимикробная фотодинамическая терапия перед традиционными методами лечения?

Прежде всего, следует сказать, что эффективность фотодинамической терапии не зависит от спектра чувствительности микроорганизмов к антибиотикам. Более того, метод в равной степени губителен для бактерий, простейших, грибов и вирусов.

Поскольку повреждающее действие фотохимического процесса обусловлено свободнорадикальными реакциями, развитие микробной устойчивости к ФДТ практически исключено. Кроме того, фотосенсибилизаторы, в отличие от антибиотиков, не обладают токсическим и мутагенным действием, которое зачастую способствует селекции резистентных штаммов [9].

Бактерицидное действие носит локальный характер и лимитируется зоной лазерного облучения сенсibilизированных тканей. При этом удается избежать характерного для антибиотиков и антисептиков поражения нормальной микрофлоры в зонах, не подлежащих лечению.

Фотодинамическая терапия одинаково эффективна при острой и хронической инфекции, а также при некоторых видах бациллоносительства [10].

Собственное исследование

Целью нашей работы явилось экспериментальное обоснование применения метода фотодинамической терапии для лечения заболеваний периодонта.

Мы ставили перед собой следующие задачи:

- получить экспериментальную модель периодонтита;
- подробно отработать методику выполнения процедуры фотодинамической терапии;
- определить дозы фотосенсибилизатора и лазерного излучения, необходимые для проведения эффективной и безвредной процедуры;
- разработать оптимальную схему лечения хронического периодонтита (количество процедур, интервал между ними) на примере экспериментальной модели;
- описать динамику клинического состояния тканей периодонта при проведении лечения;
- изучить гистологические изменения в тканях периодонта при проведении лечения;
- используя бактериологические методы, определить эффективность противомикробного действия фотодинамической терапии.

Описание экспериментальной методики

Модель заболевания была получена у лабораторных животных, в качестве которых были выбраны крысы линии Вистар. Эксперимент проводился на 125 животных обоего пола, средней массой 300-350 грамм, содержащихся в обычных условиях вивария и получающих общепринятый пищевой рацион. Все животные, в зависимости от метода лечения, были разделены на 5 групп по 25 животных в каждой: первую составили крысы со здоровым

периодонтом; вторую – животные с экспериментальным периодонтитом, лечение которых не проводилось; третью – животные с экспериментальным периодонтитом, которым проводилась лазеротерапия; в четвертой были крысы с экспериментальным периодонтитом, которым проводилась фотодинамическая терапия; животным пятой группы осуществлялось облучение периодонтальных тканей лазером по схеме, используемой для ФДТ, но без применения фотосенсибилизатора.

Пятая группа была выделена с целью детерминирования эффектов собственно фотодинамической терапии и отделения их эффектов изолированного лазерного излучения.

Оценка результатов проведенного лечения включала наблюдение за общим состоянием животных и изучение состояния тканей периодонта, которое проводилось с использованием клинических и микробиологических методов. При визуальном и инструментальном исследовании оценивались такие признаки как: гиперемия, отечность, изменения конфигурации десны, атрофические и гиперпластические процессы. Индексная оценка осуществлялась с использованием пробы Шиллера-Писарева (интенсивность воспалительного процесса) и показателя кровоточивости десны. Проводилось измерение количества десневой жидкости.

Наблюдение за качественными и количественными изменениями в микрофлоре периодонтальных тканей осуществлялось с использованием бактериологических методов.

Процедура фотодинамической терапии осуществлялась дважды с интервалом в 3 дня. Оценка состояния тканей периодонта проводилась до лечения, через сутки после первой процедуры, через сутки после второй процедуры и далее на третий, пятый, седьмой и четырнадцатый дни.

Методика выполнения процедуры ФДТ

Перед процедурой животное вводилось в наркоз (Sol. Thiopentali 1%-2 ml, – внутривенно), плотно фиксировалось на планшетном столике при помощи резиновых колец, нижняя губа отводилась книзу. Далее на высушенную поверхность десны наносился препарат в виде геля и равномерно распределяется кисточкой до тонкой однородной пленки. По истечении времени экспозиции (7-10 минут), которое необходимо для диффузии препарата, излишки геля удалялись, а поверхность обработанных тканей облучалась лазером. Плотность мощности светового потока была равной 125 мВт/см², доза излучения составляла 50 Дж/см². Остатки геля, не вступившего в реакцию, удалялись струей воды.

Результаты

Клиника

Животные первой группы в течение всего периода наблюдения вели себя спокойно, хорошо принимали корм, имели блестящий шерстяной покров. Вес крыс до эксперимента и после был в пределах 300-350 грамм. При обследовании полости рта слизистая оболочка десны была бледно-розовая, без эрозий и изъязвлений, налет на зубах отсутствовал. Межзубные сосочки в области нижних резцов были остроконечные, плотно прилегали к зубам.

Зубодесневое соединение не нарушалось, кровоточивости десен не наблюдалось, маргинальная десна плотно охватывала шейки зубов. Проба Шиллера-Писарева была отрицательной. Количество десневой жидкости составило $0,030 \pm 0,002$ мг (табл. 1).

Таблица 1

Результаты клинических наблюдений в группе 1 (здоровый периодонт)

| Проба Шиллера-Писарева | Показатель кровоточивости | Количество десневой жидкости |
|------------------------|---------------------------|------------------------------|
| $0,15 \pm 0,05$ | 0 | $0,030 \pm 0,002$ |

Во 2-5 группах была получена модель хронического периодонтита. Картина экспериментальной патологии характеризовалась следующими признаками: у животных отмечалось агрессивное поведение, шерстяной покров терял блеск, масса тела снижалась на 80-100 грамм. Периодонтальные ткани были отечны, гиперемированы, цианотичны, межзубной сосочек в области нижних резцов выглядел уплощенным, маргинальная десна приобретала валикообразную форму. При зондировании отмечалась кровоточивость, в пришеечной области наблюдались обильные скопления твердых и мягких зубных отложений, присутствовал неприятный запах. Целостность зубодесневого прикрепления нарушалась с образованием патологического кармана глубиной до 2 мм. Примерно у трети животных отмечались десневые абсцессы, периостальные явления, гноетечение из карманов. Зубы, устойчивые перед началом эксперимента, приобрели патологическую подвижность I-II степени. Проба Шиллера-Писарева была положительной. Количество десневой жидкости составило $0,095 \pm 0,003$ мг.

Во второй группе описанная выше картина наблюдалась на протяжении всего периода эксперимента (табл.2). Показатели, полученные при оценке общего и периодонтального статуса животных этой группы, использовались в качестве контроля при сравнительном анализе с показателями 3, 4 и 5 групп.

Таблица 2

Результаты клинических наблюдений в группе 2 (периодонтит без лечения)

| Сроки наблюдения (сутки после получения модели заболевания) | Проба Шиллера-Писарева | Показатель кровоточивости | Количество десневой жидкости (мг) |
|---|------------------------|---------------------------|-----------------------------------|
| 1 | $2,8 \pm 0,12$ | $1,8 \pm 0,13$ | $0,95 \pm 0,003$ |
| 7 | $2,6 \pm 0,14$ | $1,8 \pm 0,13$ | $0,85 \pm 0,005$ |
| 14 | $2,7 \pm 0,14$ | $1,6 \pm 0,13$ | $0,90 \pm 0,004$ |
| $P_{1,7}$ | $>0,05$ | $>0,05$ | $>0,05$ |
| $P_{7,14}$ | $>0,05$ | $>0,05$ | $>0,05$ |
| $P_{1,14}$ | $>0,05$ | $>0,05$ | $>0,05$ |

В третьей, четвертой и пятой группах была получена модель хронического периодонтита и проведено лечение. Животным третьей группы был проведен курс лазеротерапии (длина волны излучения 670 нм, плотность мощности 125 мВт/см^2 , длительность воздействия 4 минуты, доза за 1 процедуру 30 Дж/см^2), состоящий из 10 процедур, выполняемых ежедневно. В процессе лечения наблюдались следующие изменения: после 4-5 процедур клиническое состояние десны улучшилось, уменьшилась гиперемия и отек, снизилось количество десневой жидкости. Средний показатель пробы

Шиллера-Писарева составил $1,9 \pm 0,15$. Цианоз и кровоточивость сохранялись. К моменту окончания курса, ярких признаков воспаления в периодонте животных не наблюдалось, слизистая десны приобрела нормальную консистенцию, показатель кровоточивости и количество десневой жидкости снизились до $0,35 \pm 0,04$ и $0,055 \pm 0,002$ соответственно. Показатель пробы Шиллера-Писарева составил $0,9 \pm 0,13$. На 7-ой день после окончания лечения было отмечено некоторое уменьшение подвижности зубов и снижение глубины периодонтальных карманов. Между 7 и 14 днем клинически значимых отличий не наблюдалось (табл. 3).

Таблица 3

Результаты клинических наблюдений в группе 3 (лазеротерапия)

| Сроки наблюдения | Проба Шиллера-Писарева | Индекс кровоточивости | Количество десневой жидкости (мг) |
|------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------------------|
| до лечения | $2,6 \pm 0,13$ | $1,76 \pm 0,15$ | $0,084 \pm 0,004$ |
| 1 процедура | $2,6 \pm 0,13$ | $1,69 \pm 0,08$ | $0,084 \pm 0,004$ |
| 3 процедура | $2,3 \pm 0,15$ | $1,42 \pm 0,03^*$ | $0,072 \pm 0,002^*$ |
| 5 процедура | $1,9 \pm 0,15^*$ | $1,22 \pm 0,02^*$ | $0,070 \pm 0,002^*$ |
| 7 процедура | $1,5 \pm 0,13^*$ | $0,70 \pm 0,04^*$ | $0,065 \pm 0,002^*$ |
| 10 процедура | $0,9 \pm 0,13^*$ | $0,35 \pm 0,04^*$ | $0,055 \pm 0,002^*$ |
| через 7 суток | $0,8 \pm 0,15^*$ | $0,30 \pm 0,02^*$ | $0,050 \pm 0,003^*$ |
| через 14 суток | $0,8 \pm 0,15^*$ | $0,28 \pm 0,03^*$ | $0,052 \pm 0,003^*$ |

*- $p < 0,05$ по сравнению с исходными показателями (до лечения).

В четвертой группе проводилась фотодинамическая терапия. Процедура осуществлялась двукратно с интервалом в 3 дня по описанной выше методике. Через сутки после первой процедуры были выявлены следующие изменения: резко снизилась кровоточивость и количество десневой жидкости. Прекратилось гноетечение из зубодесневых карманов, поверхность эрозий подсохла и затянулась пленкой. Значительно уменьшился отек.

Через сутки после второй процедуры отек и кровоточивость практически исчезли, десна стала приобретать нормальный цвет. Резко уменьшилось количество зубных отложений (несмотря на отсутствие механического воздействия). Показатели пробы Шиллера-Писарева снизились до $1,22 \pm 0,2$.

На 3-5 день количество десневой жидкости достигло значений нормы, проба Шиллера-Писарева стала отрицательной, исчез неприятный запах. Глубина карманов уменьшилась до 1мм (до лечения 2 мм), патологическая подвижность снизилась до I степени (II степень до лечения), десна стала приобретать нормальную конфигурацию. Эффект лечения был стойк и сохранялся на протяжении всего периода исследования (табл. 4).

Таблица 4

Результаты клинических наблюдений в группе 4 (ФДТ)

| Сроки наблюдения | Проба Шиллера-Писарева | Индекс кровоточивости | Количество десневой жидкости (мг) |
|------------------------------|--|--|--|
| до лечения | 2,7±0,13 | 1,76±0,15 | 0,086±0,002 |
| 1-ая процедура через 1 сутки | 2,7±0,15 | 0,55±0,04* | 0,055±0,004* |
| 2-ая процедура через 1 сутки | 1,22±0,13* | 0,34±0,03** | 0,04±0,003** |
| через 3 суток | 0,6±0,13** | 0,14±0,02** | 0,045±0,002** |
| через 5 суток | 0,4±0,1** | 0,12±0,04** | 0,035±0,002** |
| через 7 суток | 0,2±0,03** | 0** | 0,032±0,003** |
| через 14 суток | 0,3±0,09** | 0** | 0,030±0,002** |
| Расшифровка индексов | * - p<0,05 по сравнению с исходными данными (до лечения) ** - p<0,05 по сравнению с данными, взятыми через 1 сутки после 2-ой процедуры | * - p<0,05 по сравнению с исходными данными (до лечения) ** - p<0,05 по сравнению с данными, взятыми через 1 сутки после 1-ой процедуры | * - p<0,05 по сравнению с исходными данными (до лечения) ** - p<0,05 по сравнению с данными, взятыми через 1 сутки после 1-ой процедуры |

Животным пятой группы проводилось лазерное облучение периодонта, по параметрам и дозе идентичное таковому при проведении ФДТ (2 процедуры с интервалом 3 дня, плотность мощности излучения 125 мВт/см², доза 50 Дж/см²). Наблюдения показали, что после второй процедуры изменений в общем состоянии животных не наблюдалось, отек несколько уменьшился, однако гиперемия и цианоз сохранялись на прежнем уровне. Проба Шиллера – Писарева была положительной, показатели кровоточивости не изменились, имелось уменьшение количества десневой жидкости (с 0,095±0,003 мг до 0,072±0,002 мг, (p<0,001)). В течение первой недели результаты лечения сохранялись, после чего отечность тканей и количество десневой жидкости вернулись к исходному уровню. Изменений со стороны целостности зубодесневого соединения и подвижности зубов выявлено не было. Таким образом, двукратное облучение слизистой оболочки десны лазером не оказало существенного влияния на ее клиническое состояние (табл. 5).

Таблица 5

Результаты клинических наблюдений в группе 5 (лазерное воздействие по схеме ФДТ)

| Сроки наблюдения | Проба Шиллера-Писарева | Индекс кровоточивости | Количество десневой жидкости |
|------------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------------|
| до лечения | 2,6±0,16 | 1,82±0,13 | 0,085±0,002 |
| 1-ая процедура через 1 сутки | 2,6±0,18 | 1,80±0,13 | 0,086±0,004 |
| 2-ая процедура через 1 сутки | 2,7±0,16 | 1,79±0,11 | 0,072±0,004* |
| Через 3 суток | 2,6±0,16 | 1,79±0,13 | 0,070±0,002* |
| Через 5 суток | 2,6±0,16 | 1,69±0,13 | 0,074±0,002* |
| Через 7 суток | 2,7±0,18 | 1,80±0,16 | 0,080±0,004 |
| Через 14 суток | 2,7±0,16 | 1,81±0,16 | 0,086±0,004 |

*-р < 0,05 по сравнению с исходными показателями (до лечения).

Динамика исследуемых клинических показателей в группах представлена в виде графиков на рисунках 1-6.

Из полученных данных видно, что при данной дозе лазерного излучения, добиться выраженного терапевтического эффекта можно, лишь сочетая его применение с действием фотосенсибилизатора. Следовательно, описанный результат есть следствие взаимодействия двух этих компонентов и возникающей при этом фотохимической реакции.

Полученные результаты сохранялись на протяжении всего периода наблюдений.

Микробиология

Основной мишенью фотодинамической терапии являются патогенные микроорганизмы. Поэтому одной из главных задач было сравнить уровень микробной обсемененности тканей периодонта до фотодинамического воздействия и после него. Забор материала осуществлялся по следующей методике: при помощи желатиновых тампонов получали мазок непосредственно с поверхности десны. Далее тампон помещали в пробирку и заливали 0,9 мл физиологического раствора, из которого в последующем готовили разведения 1:10, 1:100, 1:1000. Каждое разведение высевали на плотные питательные среды – кровяной агар, желточно-солевой агар, среду Левина, среду Сабуро, анаэробную среду. При этом выделялись следующие виды микробов: альфа-гемолитический стрептококк, бета-гемолитический стрептококк, негемолитический стрептококк, стафилококк, энтеробактерии, бациллы, кандиды, анаэробы. Результаты выражались в колониеобразующих единицах, а именно в десятичном логарифме, взятом от количества КОЕ.

Для экспериментального периодонтита была характерна следующая микробная картина. Негемолитический стрептококк (4,2±0,2), стафилококк (5,0±0,1), энтеробактерии (3,6±0,15) и анаэробы (3,4±0,2) высевались в 100% случаев. Бета-гемолитический стрептококк (4,6±0,15) высевался в 33% случаев и кандиды (3,1±0,1) в 10% случаев. Альфа-гемолитический стрептококк и бациллы не высевались.

Следует сказать, что развитие экспериментального периодонтита сопровождалось значительным повышением уровня микробной обсемененности, о чем свидетельствуют сравнительные данные по первой группе животных (здоровый периодонт). Так при интактном периодонте высевались только стафилококки (2,0±0,1), энтеробактерии (до 50 клеток в мазке) и анаэробы (до 30 клеток в мазке).

Фотодинамическая терапия оказывала выраженное влияние на состояние микрофлоры пораженного периодонта. Так после процедуры в 72,3 % случаев поверхность десны была полностью стерильна (не высевалось ни одного из указанных видов). В остальных случаях имелось снижение количества определяемых микроорганизмов как минимум на два порядка. Среди микроорганизмов, выделенных после проведения ФДТ, данные распределились следующим образом: в 100% случаев высевались стафилококк ($2,0 \pm 0,1$) и анаэробы ($1,2 \pm 0,15$), в 54 % случаев были выделены энтеробактерии ($1,4 \pm 0,1$) и в 45% негемолитический стрептококк ($2,0 \pm 0,2$). Бета-гемолитический стрептококк и кандиды не выделялись.

Из полученных данных видно, что фотодинамическая терапия не обладает явной избирательностью действия по отношению к тому или иному виду микроорганизмов, и в подавляющем большинстве случаев (72,3%) погибает вся имеющаяся микрофлора. Среди микроорганизмов, выделенных после лечения, несколько большая чувствительность была отмечена у энтеробактерий (высевались только в 54% случаев) и негемолитического стрептококка (45 % случаев). Следует обратить внимание на антимикотическое действие: посев на грибы рода *Candida*, которые были выделены в 10% случаев до лечения, после лечения роста не дал.

Изучение бактерицидной активности лазерного излучения (без использования фотосенсибилизатора), показало, что отличия между показателями микробной обсемененности до и после облучения находятся в пределах ошибки достоверности. Сам по себе препарат также не проявил антимикробных свойств. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что наблюдаемый бактерицидный эффект обусловлен фотохимической реакцией, возникающей только при взаимодействии света и фотосенсибилизатора.

Известно, что большое количество микроорганизмов локализовано подповерхностно, в межклеточных пространствах эпителиального пласта. Они недоступны для действия антисептиков и зачастую являются причиной рецидива воспалительного процесса. Уничтожение таких микроорганизмов при помощи ФДТ возможно за счет способности фотосенсибилизатора и лазерного излучения проникать в ткань на определенную глубину. Проникновение фотосенсибилизатора обусловлено его способностью растворяться в белково-липидных комплексах мембран, для лазерного же излучения эта способность определяется такими свойствами как когерентность и монохроматичность электромагнитных волн в световом потоке. Удачным совпадением также можно назвать тот факт, что пик поглощения хлорина е6 (660-670 нм) лежит в пределах красной области спектра, а красный свет, как известно, обладает наибольшей в диапазоне проникающей способностью.

На основании полученных результатов, можно сделать вывод о том, что фотодинамическая терапия обладает выраженным антимикробным действием в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также грибов. Кроме того, тип дыхания не является фактором,

определяющим восприимчивость микроорганизмов к ФДТ: процедура в равной степени вызывает гибель аэробов, факультативных и облигатных анаэробов.

Выгодным преимуществом фотодинамического воздействия, является возможность локального избирательного поражения микробных клеток, расположенных как поверхностно, так и в межклеточных пространствах, без побочного влияния на окружающие ткани и микрофлору соседних зон.

Выводы

1. Фотодинамическая терапия может стать в ближайшем будущем реальной альтернативой традиционным методам антибактериального воздействия.
2. Полученные экспериментальные данные позволяют утверждать о возможности и эффективности применения ФДТ в клинике стоматологии вообще, и с использованием разработанной нами методики (препарат, дозы) в частности.

Литература

1. Заблодский, А.Н., Плавский, В.Ю., Мостовников, В.А. и др. Эндоскопическая лазерная фотодинамическая терапия геликобактер-ассоциированной патологии у детей (клинико-экспериментальное исследование) // Мат-лы межд. конф. «Лазеры в биомедицине». – Минск, 2003. – С. 297-305.
2. Емельяненко, Л.А., Блоцкий, А.А. Иммуно-биохимическая оценка эффективности фотодинамической и антиоксидантной терапии больных хроническими синуситами // Новости отоларингологии и логопатологии. – 2001. – С. 54-56.
3. Странадко, Е.Ф. Исторический очерк развития фотодинамической терапии // Лазерная медицина. – 2002. – Т.6, вып. 1. – С. 4-8.
4. Странадко, Е.Ф. Фотодинамическая терапия злокачественных опухолей и неопухолевых заболеваний / Материалы 2-го Всеросс. Симпозиума «Фотодинамическая терапия злокачественных новообразований». – Москва, 1997. – С. 20-23.
5. Странадко, Е.Ф., Корабоев, У.М., Толстых, М.П. Фотодинамическая терапия при гнойных заболеваниях мягких тканей // Хирургия. – 2000.-№9.-с. 67-70.
6. Корабоев, У.М. Фотодинамическая терапия гнойных ран и трофических язв: Дисс. д-ра мед. наук. – М., 2001.-178 с.
7. Raab, O. Uber die Wirking fluorescirender Stoffe auf Infusorien // Z. Biol. – 1900. – Vol. 39. – P. 524-546.
8. Jesionek, A., Tappeiner H. Zur Behandlung der Hautcarcinome mit fluorescierenden Stoffen // Dtsch. Arch. Klin. Med. – 1905. – Vol. 82. – P. 223-226.
9. Malik, Z., Ladan H., Nitzan Y., Smetana Z. Antimicrobial and antiviral activity of porphyrin photosensitization. In: Photodynamic therapy of cancer. G. Jori, J. Moan, W. Star (eds.). Proc. SPIE 2078. 1994; - P.305-312.
10. Wilson, M., Pratten J., Lethal photosensitization of Staphylococcus aureus in vitro: effect of growth phase, serum, and pre-irradiation time

11. Cookson, B.D., Farrelly, H., Stapleton, P., Garvey, R.P.G., Price, M.R. Transferable resistance to triclosan in MRSA, *Lancet* 337 (1991) - P.1584-1549.
12. Nickel, J.S., Ruseska, I., Wright, J.B., Costerton, J.W., Tobramycin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* cells growing as a biofilm on urinary catheter material, *Antimicrob. Agents Chemother.* 27 (1985) - P. 619-624.
13. Christerson, L.A., Albin, B., Zambon, J.J., Wikesjo, U.M.E., Genco, R.J., Tissue localization of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontitis, *J. Periodontol.* 58 (1987) - P.529-539.