

**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ**  
**„ПРОФ. Д-Р ПАРАСКЕВ СТОЯНОВ“ - ВАРНА**  
**ФАКУЛТЕТ ПО ДЕНТАЛНА МЕДИЦИНА**  
**Катедра “Консервативно зъблечение и орална патология”**

---

**Д-р Мая Димитрова Дойчинова**

**ПРОФИЛАКТИКА НА ЗЪБНИЯ КАРИЕС**  
**С ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРИ (ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ,**  
**ЛАБОРАТОРНИ И КЛИНИЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ)**

**А В Т О Р Е Ф Е Р А Т**

на дисертационен труд  
за присъждане на образователна и научна степен  
„ДОКТОР“

**НАУЧНА СПЕЦИАЛНОСТ**

Терапевтична стоматология

**НАУЧЕН РЪКОВОДИТЕЛ**

проф. д-р Славчо Крумов Димитров, д.м.

**ОФИЦИАЛНИ РЕЦЕНЗЕНТИ**

Проф. д-р Радосвета Василева, д.м.

Доц. д-р Веселин Късовски, д.м.

Варна, 2015 г.

Дисертационният труд съдържа 203 стандартни страници и е онагледен с 75 фигури, 41 таблици и 5 приложения. Библиографията включва 195 литературни източника, от които 17 на кирилица и 178 на латиница.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита на катедрен съвет на Катедра по консервативно зъболечение и орална патология при МУ „Проф. д-р Параскев Стоянов“ - Варна на 05.03.2015г.

Публичната защита ще се състои на ..... от .....часа в аудитория „ Доц. Димитър Клисаров на ФДМ, МУ Варна, пред научно жури в състав:

**Председател:**

Проф. д-р Радосвета Василева, д.м.- вътрешен член и рецензент

**Членове:**

Проф. д-р Славчо Димитров, д.м. - научен ръководител и вътрешен член

Проф. д-р Иван Филипов, д.м. - външен член

Доц. д-р Нешка Манчорова, д.м. - външен член

Доц. д-р Веселин Късовски, д.м. - външен член и рецензент

Материалите по защитата са на разположение в научен отдел на МУ- Варна и са публикувани на интернет страницата на МУ- Варна.

## **Благодарности**

*На Проф. Сл. Димитров - за това, че с присъщата си скромност откри нови необятни хоризонти пред мен и за това, че в хода на съвместния ни труд, се научих да бъда по-търпелива и смирена.*

*На МУ Варна - за шанса и финансовата подкрепа.*

*На Доц. Късовски - за това, че вече знам какво е МакФарланд стандарт и че един път не загуби търпение пред безкрайните ми въпроси, при овладяването на CFU/ml. И за всичко!*

*На Проф. Василева и Доц. Стоева - за лъча светлина и спокойствие в тежък и неуверен момент.*

*На Геновева Радева и Доц. Мутафова - за неоценимата статистическа помощ.*

*На Д-р Симо, Ива, Тони и Крис - за съкровището на вечното приятелството, за слънцето, радостта и изпетите песни и за безценния дар наречен лоялност.*

*На Такухи - за това, че ми помогна да прекося реката за пореден път, че с лекота укротява скачащи маймуни и е способна с едно изречение, да ме върне към същността ми.*

*На Доц. Тончев и на Доц. Абаджиев - за безусловната и фундаментална помощ по всяко време. Дори в неделни, проливни следобеди, когато всички си почиват!*

*На Полина, Пламен, Майя и Жоро - за търпението и за гъделичкащото удоволствие да общуваши и да се учиш от следващото поколение, което е невероятно способно, умно и уверено.*

*На Меги Балчева - за това, че с красив замах показва най-доброто Практическо приложение на теорията за защита на дисертациите!*

*На сестра Иванова - за обичта и чая със захар, покрит със салфетка, за да не натрупва пластмасови и биологични отпилки.*

*На Ники - за сблъсъка със стимулиращ интелект и за смелостта да ми се довери.*

*На Еми, Ивелина, Петя и Мила - за административната и техническа помощ, съвети, обяснения, търпение и отзивчивост, винаги!*

*На всички вдъхновяващи с нетърпението си студенти, които не престанаха да задават въпроса **кога?***

*На колегите-съмишленици - за доверието, положителното отношение и подкрепата.*

*На прекрасната ми, свободна, нестандартна, красива, умна и смела дъщеря Лидия, която никога не бърза; певец, артист, оператор, преводач и волен ездач, и която прояви нечовешко за възрастта си търпение - за това, че всеки ден ме кара да преоткривам смисъла и да забавя крачка.*

*И не на последно място, с цялата ми обич и признателност, на голямото ми семейство и мъжа до мен. За благословията да живея с тях!*

- ❖ *Микробиологичните изследвания са проведени в БАН, Институт по микробиология „Стефан Ангелов“, асоцииран с институт „Пастьор“ Париж.*
- ❖ *Използваните в изследванията металфталоцианини са синтезирани по проект Грант DO-02-177/08, ФНИ, МОН, България.*
- ❖ *Статистиката е консултирана с проф. Емануела Мутафова и Геновева Радева, Факултет по Обществено здраве, МУ-Варна.*

# СЪДЪРЖАНИЕ

<b>ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ И ОБОЗНАЧЕНИЯ</b> .....	7
<b>ВЪВЕДЕНИЕ</b> .....	9
<b>ЦЕЛ И ЗАДАЧИ</b> .....	11
<b>МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ</b> .....	12
1. Материали .....	12
2. Методи използвани в първа задача .....	15
3. Методи използвани във втора задача .....	15
4. Методи използвани в трета задача .....	17
5. Методи използвани в четвърта задача .....	18
6. Статистически методи .....	19
<b>РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ</b> .....	20
1. Резултати от първа задача - проучване нивото на кариесната профилактика чрез анкетна карта .....	20
1.1. Обсъждане на резултатите от анкетата .....	44
1.2. Заключение .....	46
2. Резултати от втора задача - изследване <i>in vitro</i> на антимикробния ефект на фотосенсибилизатори, разрешени за клинично приложение (метиленово синьо, ФотоСан®) и създадените в нашата страна металфталоцианини (Zn-, Si-, Ga-фталоцианин) върху лабораторни референтни щамове на <i>Streptococcus mutans</i> .....	48
2.1. Обсъждане на резултатите от втора задача .....	52
3. Резултати от трета задача - проучване <i>in vitro</i> на антимикробния ефект на разрешения за клинично приложение фотосенсибилизатор ФотоСан® и създадения в нашата страна Zn- фталоцианин, върху клинично изолирани от зъбна плака МО - <i>Streptococcus mutans</i> и <i>Streptococci species</i> .....	54
3.1. Обсъждане на резултатите от трета задача .....	63
4. Резултати от четвърта задача - изследване <i>in vivo</i> плакинхибиращото действие на разрешените за клинична употреба у нас фотосенсибилизатори ФотоСан® и Метиленово синьо при възрастни индивиди .....	65
4.1. Обсъждане на резултатите от четвърта задача .....	76
6. Препоръки .....	80

<b>ИЗВОДИ .....</b>	<b>81</b>
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....</b>	<b>84</b>
<b>САМООЦЕНКА НА ПРИНОСИТЕ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД .....</b>	<b>86</b>
<b>ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ .....</b>	<b>87</b>
1. Публикации .....	87
2. Участия в научни форуми .....	87

## ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ И ОБОЗНАЧЕНИЯ

<b>АФДТ</b>	Антибактериална фотодинамична терапия
<b>БДЛ</b>	Бели деминерализационни лезии
<b>БФР</b>	Буфериран физиологичен разтвор
<b>ДМСО</b>	Диметил сулфоксид
<b>ЕЗФП</b>	Екзогенна флуорна профилактика
<b>ЕО</b>	Еозин
<b>ЕРИ</b>	Еритрозин
<b>КОХ</b>	Клинична орална хигиена
<b>КРМ</b>	Куркума
<b>МЗ</b>	Малахит зелено
<b>МО</b>	Микроорганизми
<b>МС</b>	Метиленово синьо
<b>МФЦ</b>	Металфталоцианини
<b>ПИ</b>	Плак индекс
<b>РБ</b>	Роз бенгал
<b>ТЗТ</b>	Твърди зъбни тъкани
<b>ТС</b>	Толуидиново синьо
<b>ТСА<sup>®</sup></b>	Триптиказ соев агар
<b>ФАД</b>	Фотоактивирана дезинфекция

<b>ФДТ</b>	Фотодинамична терапия
<b>ФДД</b>	Фотодинамична дезинфекция
<b>ФП</b>	Флуорна профилактика
<b>ФС</b>	Фотосенсибилизатор
<b>ФС<sup>®</sup></b>	ФотоСан <sup>®</sup>
<b>CFU</b>	Colony Forming Unit
<b>DPBF</b>	1,3 diphenylisobenzofuran
<b>LED</b>	Light Emiting Diode
<b>MRSA</b>	Methicillin resistant Staphylococcus aureus
<b>MS</b>	Mutans Streptococci
<b>MSA</b>	Mitis salivarius agar
<b>PHP</b>	Patient Hygiene Performance
<b>ROS</b>	Reactive Oxigen Species
<b>SL</b>	Silness and Loë
<b>UV-VIS</b>	Ultraviolet visible spectroscopy



## ВЪВЕДЕНИЕ

Световната здравна организация дефинира зъбния кариес като *локализиран, постеруптивен, патологичен процес с външен произход, който представлява размекване на твърдите зъбни тъкани (ТЗТ) и води до формирането на кавитация*. Зъбният кариес е социално, полиетиологично, бактериално-медирано заболяване със значителни последици за оралното и общото здраве на човешката популация.

Заболяванията свързани с микробни биофилми са едни от най-разпространените бактериални заболявания при човека. Процесът на деструкция на твърдите зъбни тъкани поради зъбен кариес е част от тези състояния на нарушено екологично равновесие. Ролята на *Mutans Streptococci (MS)* и *Lactobacilli* като съществена част от биофилма върху ТЗТ и участието им във възникването на кариозния процес в световната литература не се оспорва.

Профилактиката на зъбния кариес трябва да са насочи и към антимикробно повлияване на одонтопатогенните микроорганизми. Оралната хигиена е най-широко достъпния метод за профилактика на зъбния кариес, особено при възрастния пациент. Тя невинаги е достатъчно ефективна, поради невъзможност с помощта само на механични методи и средства да се отстрани биофилма от трудно достъпни места по зъбните повърхности т.н. предилекционни места.

Използването на антимикробни агенти и средства за химична инхибиция представлява ценно допълнение към методите за механичен контрол на плаката. Известни са и техните странични ефекти и недостатъци, които възпрепятстват дълготрайната им употребата. Антибиотиците са ефективни при редуцирането на кариесната активност при животни и при хора, но са клинично неприложими за профилактика поради неблагоприятното съотношение на странични и вторични ефекти към ползи.

Един от иновативните методи за контрол на биофилм-индуцираните заболявания е *Антибактериалната фотодинамична терапия (АФДТ)*. Въпреки, че процесът на фотодинамично инактивиране на микроорганизми съществува още от 1900 година, едва през последните 25 години, научната общност насочва отново усилията си към този метод, който се явява алтернатива на конвенционалното антибактериално лечение.

Използването на АФДТ посредством LED и подходящ фотосенсибилизатор би могла да намери своето място в профилактиката на зъбния кариес. *In vitro* изследвания с използването на толуидиново синьо и светлина от LED лампа с дължина на вълната 640 nm върху планктонична култура доказват възможността на метода да унищожи до 100 процента одонтопатогените както и, че по този начин драстично се променя растежът и строежът на биофилма.

Деструкцията на биофилми чрез АФДТ изисква приложение на видима светлина с определена дължина на вълната, за да се възбуди сенсibiliзиращия агент и да се генерират цитотоксични комплекси, които могат да предизвикат летален ефект на бактериите в биофилма. Необходим е подходящ и удобен светлинен източник, с който да могат да се облъчат всички зъбни повърхности.

Съществуват голям брой неизяснени въпроси, свързани с индикациите за приложение на АФДТ, в зависимост от преобладаващата микрофлора, вида и концентрациите на фотосенсибилизатора, от най-подходящите параметри на светлинния източник и от методиката на облъчване, с които би се постигнал максимален ефект. АФДТ е метод все още в експериментален стадий на развитие и постепенно се налага като метод на избор, предимно за повлияване на локализиранни инфекции. Биофилм-индуцираните заболявания, пародонтит, периимплантит, периапикални инфекциозни периодонтитити и зъбен кариес, са особено подходящи за профилактика и лечение с АФДТ, тъй като отговарят изцяло на изискванията за приложението на метода: контролирано въвеждане на фотосенсибилизатора в биофилма; лесен достъп на светлина и възможност за нейното топикално насочване; пространствено ограничаване на въздействието.

В настоящия дисертационен труд си поставяме за цел, да проучим възможностите на различни фотосенсибилизатори за профилактика на зъбния кариес. За постигане на тази цел ще проведем сравнителни лабораторни, експериментални и клинични изследвания.

Като взехме предвид посочените проблеми и недостатъци на съвременните методи използвани за профилактиката на зъбния кариес, спорните мнения по някои въпроси и предимствата на АФДТ, стигнахме до заключението, че са оправдани усилията за провеждане на сравнителни, лабораторни, експериментални и клинични изследвания върху

ефективността на този иновативен метод. Считаме, че изследванията могат да бъдат цел на настоящия дисертационен труд. Резултатите от тях ще отговорят на въпроса доколко е целесъобразно препоръчването и внедряването на този метод за профилактика на зъбния кариес у нас.

## ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

### Цел:

Да се проучат възможностите на някои съществуващи (разрешени за клинична употреба) и нови, създадени у нас, фотосенсибилизатори за профилактика на зъбния кариес.

### Задачи:

1. Да се проучи нивото на кариесна профилактика на възрастния пациент в дентални кабинети на територията на град Варна, посредством анкетни карти, относно най-често прилаганите методи, нивото на информираност за АФДТ в областта на денталната медицина, интереса, нагласата и потребността сред съсловието от нов метод за профилактика на зъбния кариес.
2. Да се изследва *in vitro* антимикуробния ефект на фотосенсибилизатори разрешени за клинично приложение (метиленово синьо, ФотоСан<sup>®</sup>) и създадените в нашата страна металфталоцианини (Zn-, Si-, Ga-фталоцианин) върху лабораторни референтни щамове на *Streptococcus mutans*.
3. Да се проучи *in vitro* антимикуробния ефект на разрешения за клинично приложение фотосенсибилизатор ФотоСан<sup>®</sup> и създадения в нашата страна Zn- фталоцианин, върху клинично изолирани от зъбна плака МО - *Streptococcus mutans* и *Streptococci Species*. Да се определи тяхната селективност и избере методиката на активиране касаеща: подходяща дължина на светлинните вълни; експозиция; мощност и плътност на светлината; концентрация на фотосенсибилизатора; времетраене на тъмнинното инкубиране.
4. Да се изследва *in vivo* плак-инхибиращото действие на разрешените за клинична употреба у нас фотосенсибилизатори ФотоСан<sup>®</sup> и Метиленово синьо при възрастни индивиди.

# МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

## МАТЕРИАЛИ

### По задача 1

Предмет на анализа са мненията на лекарите по дентална медицина, намерили отражение в отговорите на закритите и откритите въпроси, част от анкетната карта. Анкетната карта съдържа 17 въпроса. Данните за анкетираните са представени на Табл. 1.

Табл. 1. Брой анкетирани разпределени по признака *специалност*

Специалност	Брой анкетирани
Оперативно зъблечение и Ендодонтия (ОПЗЕ)	3
Протетична Дентална медицина (ПДМ)	9
Детска Дентална медицина (ДДМ)	6
Клинична Дентална Алергология (КДА)	2
Общо практикуващи	100

### По задача 2

**За микробиологичното изследване:** Лабораторен щам на *Streptococcus mutans* 20523:колекция DSMZ Германия; твърда хранителна среда: Триптиказ соев агар (ТСА<sup>®</sup>), допълнен с 0,3% дрожден екстракт; стандартна полистиренова плака за микротитруване с 96 кладенчета; микробиологичен бокс; термо-аеростат; 12-кладенчови пластмасови плаки за посявки на разрежданията и определяне на жизнеспособни клетки (CFU/ml).

### **Фотосенсибилизатори:**

- **Тетра-метил-пиридолокси-субституирани фталоцианинови комплекси на Zn-, Ga-, Si** - концентрация 5-6μM.
- **Метиленово синьо** - концентрация 145μM.
- **ФС** - концентрация 34μM, 136μM.

**Светлинен източник:** LED апарат с дължина на вълната 643nm - фирма ЕЛД ООД, България (Фиг. 1)

### **По задача 3**

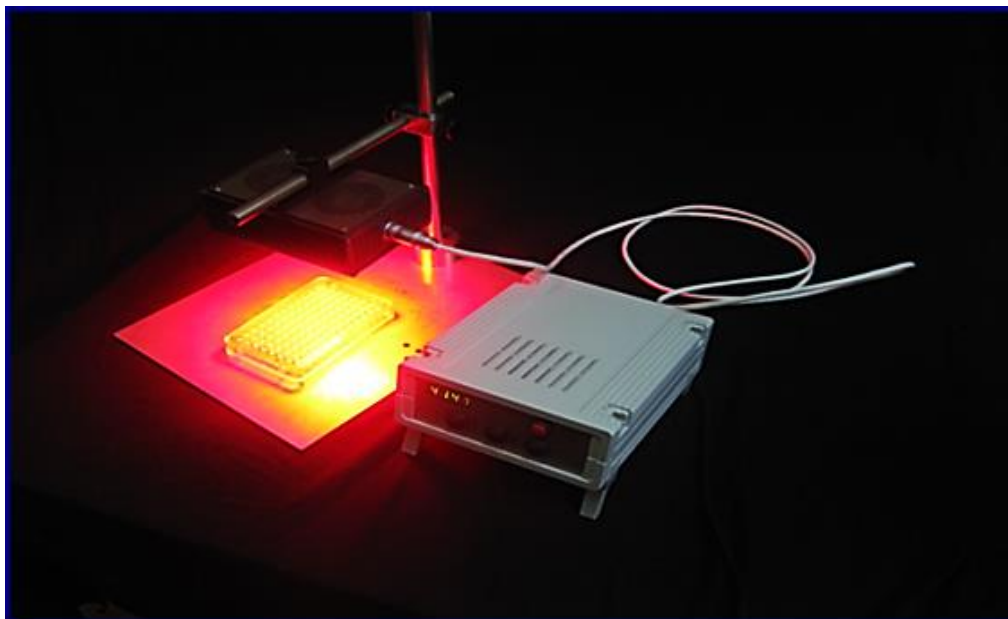
**За микробиологичното изследване:** Хранителни среди: Mitis salivarius agar (MSA<sup>®</sup>) с добавена 15% захароза за изолирането на *Streptococci species: Streptococcus mitis, Streptococcus salivarius* и *Enterococci* ; MSA<sup>®</sup> с добавена 15% захароза и 0.2 единици бацитрацин на мл, за да се култивира селективно клиничен щам на *Streptococcus mutans*.

Стандартна полистиренова плака за микротитруване с 96 кладенчета; проби от дентални биофилми на пациенти - 12 броя; *Streptococcus mutans* - клинично изолиран щам от колекцията на Института по микробиология „Стефан Ангелов“ при БАН; 12-кладенчови пластмасови плаки за посявки на разрежданията за определяне на жизнеспособни клетки CFU/ml; нефелометър за определяне на концентрацията на бактериалната суспензия по Макфарланд Стандарт-UV/Vis -2100 Spectrophotometer; микроскоп - *Amplival - Carl Zeiss Jena*; вещества за оцветяване по Грам; тестове за идентификация на *Streptococcus mutans*.

### **Фотосенсибилизатори:**

- **ФС<sup>®</sup>-медиум**, фирма CMS dental, Denmark в три крайни концентрации на активното вещество (ТС) 180μM, 90μM и 30μM.
- **Phthalocyanine zinc complex:** 40μM и 15μM.

**Светлинен източник:** LED апарат с дължина на вълната 643nm - фирма ЕЛД ООД, България (Фиг.1).



Фиг. 1. Светлинен източник 643nm - фирма ЕЛД ООД, България и 96 кладенчева полистиренова плака за микротитруване

#### По задача 4

**Контингент** - пациенти и здрави лица. Изследвани са 35 доброволци от мъжки пол, на възраст 18-45 години.

**Фоточувствителни багрила:** Метиленово синьо (сток-разтвор БФР) - 145 $\mu$ M/L вещество (*Хим. спектър ООД*) и ФС<sup>®</sup>- *CMS Dental APS, Copenhagen Denmark*

#### **Средства за професионална (клинична) орална хигиена**

**Светлинен източник** - LED лампа, Smart Dent Red, № 3494, 630nm дължина на вълната. (Фиг. 2).

#### **Помощни материали:**

Платно за кофердам, изолаторни памучни ролки, пародонтална сонда, аспираторни канюли, очила с оранжев филтър за протекция по време на облъчването



Фиг. 2. Светлинен източник - LED лампа, Smart Dent Red, №3494

## МЕТОДИ

### По задача 1

- За провеждане на проучването е използван *репрезентативен извадков метод*, който е приложен на база личен контакт.
- Методът за набиране на информацията е *пряка индивидуална анкета*.
- Продължителността на социологичното изследване обхваща период от 90 дни.

### По задача 2

- **Методика на АФДТ и микробиологичното изследване:**

Проби от бактериална суспензия на лабораторен щам на *Streptococcus mutans* 20523 колекция DSMZ Германия, с гъстота  $10^6$  по Макферланд се инкубират в продължение на 15 минути, на тъмно, при стайна температура със следните багрилни вещества:

1. **Фотосан (ФС®) 1** - концентрация на активното вещество толуидиново синьо (ТС)  $34\mu\text{M}$ .

2. **ФС® 2** - концентрация на активното вещество ТС 136µМ.
3. **Zn-металфталоцианин** - концентрация на активното вещество 5,6µМ.
4. **Si-фталоцианин** - концентрация на активното вещество 5,6µМ.
5. **Ga-фталоцианин** - концентрация на активното вещество 5,6µМ.
6. **Метиленово синьо (МС) сток разтвор** - концентрация на активното вещество 145µМ.

След тъмнинното инкубиране, 200µL от всяка от шестте инкубационните смеси се поставя в стандартна полистиренова плака за микротитруване с 96 кладенчета, където се провежда облъчването за 15 минути.

Контролни проби:

- Бактериална суспензия без добавен фотосенсибилизатор на тъмно.
- Бактериална суспензия без добавен фотосенсибилизатор с облъчване.
- Бактериална суспензия с добавен фотосенсибилизатор, но без облъчване (тъмнинна токсичност).

След облъчването на пробите и контролите се приготвят десетократни разреждания във трикратно буфериран физиологичен разтвор (БФР). Правят се посеви в петрита в среда от ТСА® с 0,3% дрожден екстракт за определяне CFU/ml.

Броят на колонии, CFU/ml, при всяко разреждане се отчита след 48h инкубация при 37°C и микроаерофилно култивиране (5% CO<sub>2</sub>), по техниката *candle-jar*.

Всяка от пробите - същинската АФДТ и контролните, се провежда трикратно.



### По задача 3

#### ➤ Методика на АФДТ и микробиологичното изследване:

Стерилен конец се прекарва през междузъбните пространства на зъби 34, 35, 36, 37, както и на зъби 14, 15, 16, 17 и се поставя в 3 мл БФР като транспортна хранителна среда. Центрофугира се на центрофуга *Vortex* за 30 сек, което позволява да се отдели плаката от конца и да се хомогенизира суспензията.

Изготвя се бактериална суспензия с концентрация  $10^6$  клетки (гъстота по Макфарланд-Стандарт № 2).

Бактериалните суспензии се инкубират в продължение на 15 минути на тъмно при стайна температура с равен обем ФС<sup>®</sup> (течна форма) с три крайни концентрации на активното вещество: 180μМ (1:2 крайно разреждане на ФС<sup>®</sup>); 90 μМ (1:4 крайно разреждане на ФС<sup>®</sup>); 30μМ (1:12 крайно разреждане на ФС<sup>®</sup>). След тъмнинното инкубиране, 200μL от инкубационните смеси се поставят в стандартна полистиренова плака за микротитруване с 96 кладенчета, където се провежда облъчването.

Използваният светлинен източник е LED с дължина на вълната 643nm. Параметрите на облъчване са както следва:

- **Плътност на мощността** 100mW/cm<sup>2</sup> (контролирана чрез фотометър Spectra Physics, USA)
- **Светлинната доза** е 12J/cm<sup>2</sup> (време на експозиция - 2 min) и 60 J/cm<sup>2</sup> (време на експозиция - 10 min).

Контролни проби:

- Бактериална суспензия без добавен фотосенсибилизатор на тъмно.
- Бактериална суспензия без добавен фотосенсибилизатор с облъчване.
- Бактериална суспензия с добавен фотосенсибилизатор, но без облъчване (тъмнинна токсичност).

След облъчването на пробите и контролите си приготвят десетократни разреждания във БФР. Правят се посеви в петрита със среда от MSA<sup>®</sup>, съдържащ 15% захароза за определяне общия брой *Streptococcus*

*species* и в MSA<sup>®</sup>, съдържащ 15% захароза, 0.2 единици бацитрацин на мл за определяне на *Streptococcus mutans*.

Колониите се идентифицират морфологично и физико-химично за доказване на принадлежността им към *Streptococcus mutans*.

Броят на колониите, CFU/ml, при всяко разреждане се отчете след 48 h инкубация при 37° C и микроаерофилно култивиране (5% CO<sub>2</sub>), по техниката *candle-jar*.

С изцяло повторение на опитната постановка и описаната методика, 12 бактериални суспензии от микробните дентални плаки с бактериална гъстота 10<sup>6</sup>, стандарт №2 по Макфарланд, се смесват с Phthalocyanine zinc complex: 2, 9, 16, 23-*tetrakis* (3-methylpyridyloxy) *phthalocyanine zinc* (Zn-фталоцианин) -15µM и се инкубират на тъмно за 15 минути.

Проведени бяха предварителни пилотни експерименти с Zn-фталоцианин 40 µM и продължителност на осветяването 2, 5 и 10 минути.

#### **По задача 4:**

##### **➤ Методика на АФДТ *ин vivo*:**

##### **Първо посещение:**

Провежда се КОХ на съзъбието.

Контролната група (зъбите от лявата долночелюстна половина - 33, 34, 35, 36, 37) се покрива с платно от кофердам като светлинна бариера. Третираната група зъби (43, 44, 45, 46, 47) се подсушава и облива с 2 мл разтвор на ФС<sup>®</sup>, включително в междузъбните пространства и със съответно 145 µM/L метиленово синьо във формата на БФР сток- разтвор.

Тъмнинно инкубиране е 1 минута. Облъчването се провежда със светлинен източник, LED лампа, *Smart Dent Red*, № 3494, 630 nm дължина на вълната, с интензитет на изхода на оптичната система, регулируем от 40 до 200 mW/cm<sup>2</sup>. Експериментите се извършват при интензивност 100mW/cm<sup>2</sup> ± 5 %, като челото на световода е на разстояние 1 до 1,5 cm от облъчваната зъбна повърхност. При такова отстояние на челото на световода от съответната зъбна повърхност се получава петно с диаметър 2 до 2,5cm. При време на облъчване 2-3 минути, дозите са от порядъка на

15-20 J/cm<sup>2</sup>. Третираната група зъби, от 43 до 47, се облъчва вестибуларно и лингвално, с две полета от 2 см, по две минути на поле. Общо време на облъчване, на третирана група зъби - 8 минути.

**Второ посещение, на 24-ия час:** Изолиране на контролна група зъби, АФДТ на експерименталната.

**Трето посещение, на 48-ия час:** Изолиране на контролна група зъби, АФДТ на експерименталната.

**Четвърто посещение, на 72-ия час:** Позитивира се зъбната плака на пациента с 0,5% разтвор на фуксин. Регистрират се плак-индекси. Провежда се професионална орална хигиена.

## **6. Статистически методи използвани в дисертационния труд:**

1. Непараметричната и параметрична теория за оценка на статистически хипотези, чрез сравняване на относителни величини от две независими извадки.
2. Изчисляване на показатели за относителен дял.
3. Използван е вариационен анализ за оценка на количествени промени.
4. Броят живи клетки е представен като средната стойност  $\pm$  стандартното отклонение. Значимостта на различията между средните стойности е оценена със **Student's t-test**. Значими са различията при **p<0.05**.
5. Графичен анализ - за визуализация на получените резултати

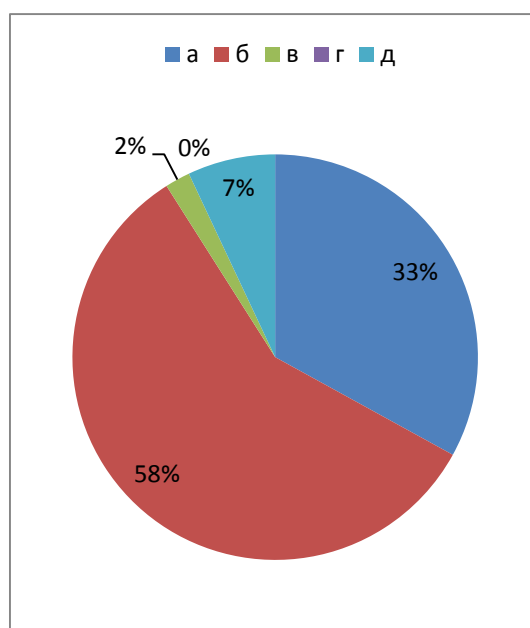
## РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

**1. Резултати от първа задача** - проучване нивото на кариесната профилактика чрез анкетна карта

**Въпрос № 1:** Разпределението на отговорите на въпрос № 1: „Какъв е броят на пациентите, които Ви посещават средно-месечно с желание за профилактичен преглед, без конкретни оплаквания?“ са показани на Табл. 2 и Фиг. 3.

Табл. 2. Разпределение на отговорите на въпрос № 1

Брой пациенти, търсеци профилактичен преглед на месец, без да имат оплаквания	Брой анкетирани n (%)
До 5 пациенти (а )	40 (33%)
Между 5-10 пациенти (б)	70 (58%)
Между 10-15 пациенти (в)	2 (2%)
Повече от 15 пациенти (г)	0 (0%)
Не могат да определят точен брой (д)	8 (7%)

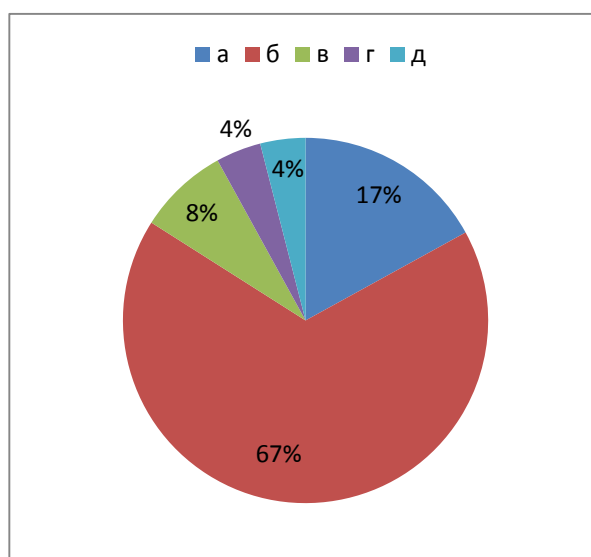


Фиг. 3. Разпределение на отговорите на въпрос № 1

**Въпрос № 2:** На втори въпрос: „Как бихте определили интереса на пациентите си към новости свързани с предпазването от зъбен кариес?“ - резултатите се разпределят по следния начин: Табл. 3, Фиг. 4.

Табл. 3. Разпределение на отговорите на въпрос № 2

Интерес от страна на пациентите	Брой анкетирувани n (%)
Умерен (а)	20 (17%)
Често задаващи подобни въпроси (б)	80 (67%)
Почти не получават подобни въпроси (в)	10 (8%)
Не съм обръщал внимание (г)	5 (4%)
Не мога да преценя (д)	5 (4%)



Фиг. 4. Разпределение на отговорите на въпрос № 2

**Въпрос № 3:** „Затруднявате ли се при диагностиката и лечението на лица с множество бели деминерализационни лезии (БДЛ) по гладките повърхности?“ Табл. 4.

Табл. 4. Разпределение на отговорите на въпрос № 3

Затруднение при лечението и диагнозата на БДЛ	Брой анкетиранни n (%)
да	88 (73%)
не	32 (27%)

**Въпрос № 4:** „Имате ли предпочитан клиничен алгоритъм за третирането им и ако да, моля посочете го?“ (Табл. 5)

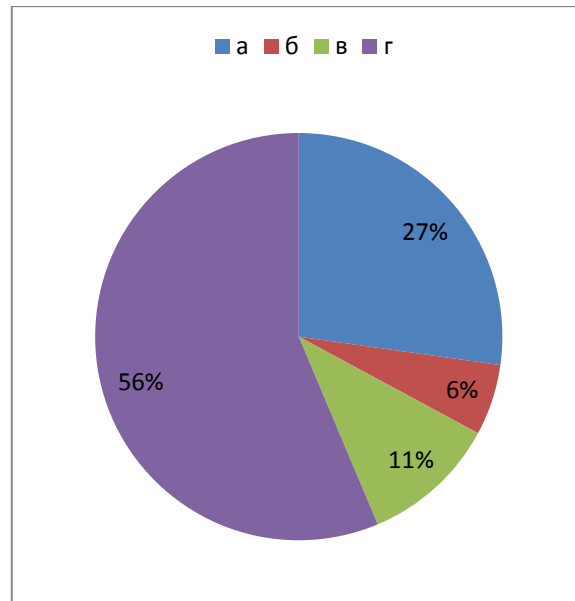
Табл. 5. Разпределение на отговорите на въпрос № 4

Наличие на предпочитан клиничен алгоритъм	Брой анкетиранни n (%)
да	43 (36%)
не	77 (64%)

Отговарящите положително, посочват като предпочитан клиничен алгоритъм следните клинични подходи (Табл. 6, Фиг. 5):

Табл. 6. Разпределение на отговорите на въпрос № 4 - свободни отговори

Предпочитан клиничен алгоритъм	Брой анкетиранни n(%)
Клинична орална хигиена (КОХ) (а)	25 (58%)
КОХ и реминерализиращи разтвори (б)	5 (12%)
КОХ и флуорни лакове и гелове (в)	10 (23%)
Реминерализиращи разтвори (г)	3 (7%)

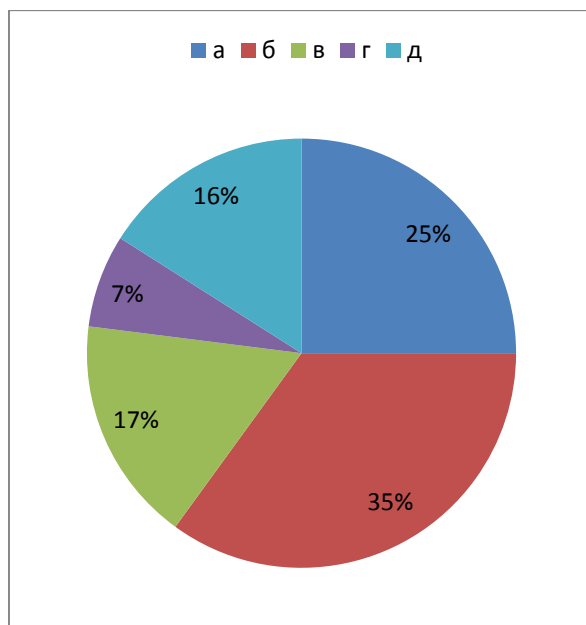


Фиг. 5. Разпределение на отговорите на въпрос № 4 - отворени отговори

**Въпрос № 5:** „Какво препоръчвате на пациентите като част от домашните грижи при справянето с белите деминерализационни лезии?“ - отговорите се разпределят както е показано на Табл. 7, Фиг. 6.

Табл. 7. Разпределение на отговорите на въпрос № 5

Домашни грижи при БДЛ	Брой анкетиращи n (%)
Промяна в диетата (а)	30 (25%)
Промяна в диетата и Тут Мус (б)	42 (35%)
Промяна в диета и препоръки за прием на поне 2 л вода на ден (в)	20 (17%)
Избягване на плодови сокове и газирани напитки (г)	9 (7%)
Тут Мус (д)	19 (16%)



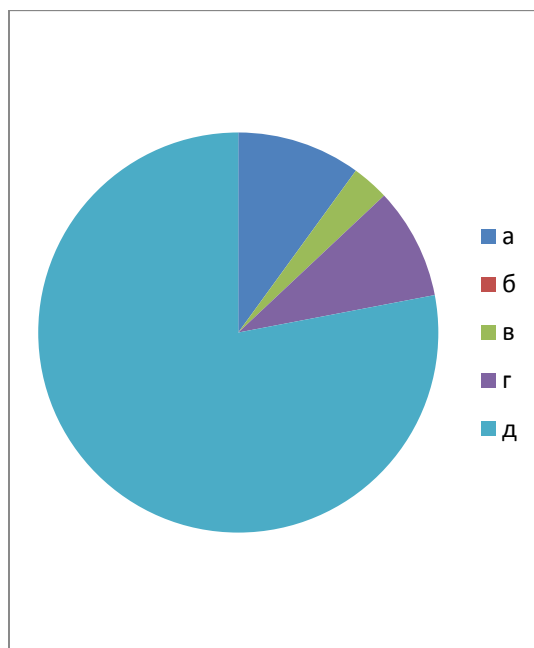
Фиг. 6. Разпределение на отговорите на въпрос № 5

**Въпрос № 6:** „Изготвяли ли сте индивидуални профилактични програми на пациенти с висок риск за развитието на кариес?“ (Табл. 8, Фиг. 7).

Табл. 8. Разпределение на отговорите на въпрос № 6

Индивидуални профилактични програми на година	Брой анкетиращи n, (%)
2-3 (а)	12 (10%)
Повече от 10 (б)	0 (0%)
Приоритет на практиката (в)	4 (3%)
Рядко, но не могат да посочат брой (г)	11 (9%)
Никога не са изготвяли програма (д)	93 (78%)



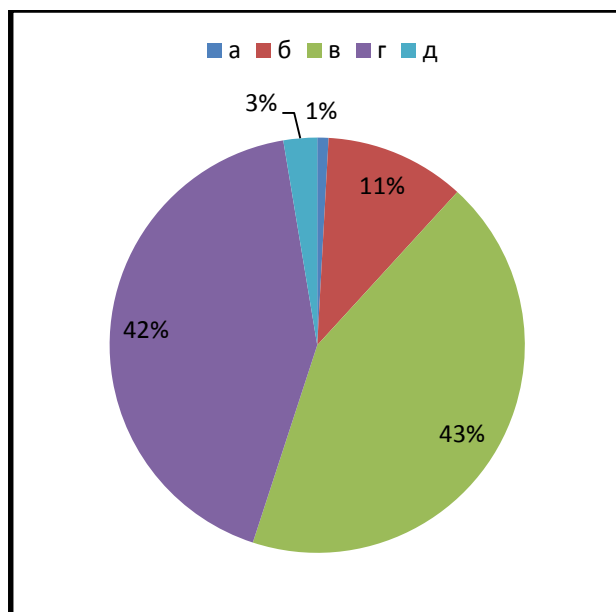


Фиг. 7. Разпределение на отговорите на въпрос № 6

**Въпрос № 7:** Резултатите от отговорите на въпроса „Кой метод като част от профилактиката на кариеса на възрастния пациент ви е най-познат?“ са систематизирани на Табл. 9, Фиг. 8.

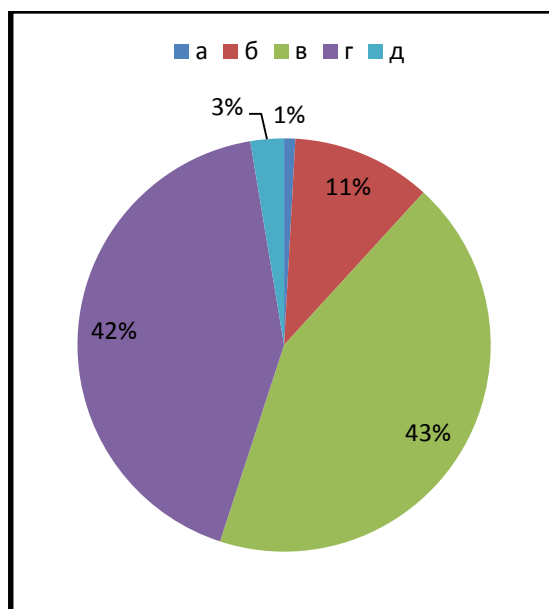
Табл. 9. Разпределение на отговорите на въпрос № 7

Метод за кариес-профилактика на възрастния пациент	Брой n (%)
Ендогенна флуорна профилактика	2 (1,7%)
Екзогенна флуорна профилактика	25 (20,9%)
Механично отстраняване на плаката	99 (82,5%)
Химично повлияване на плаката посредством разтвори	97 (80%)
Всички изброени	6 (5%)



Фиг. 8. Разпределение на отговорите на въпрос № 7

**Въпрос № 7:** „Кой от методите препоръчвате на пациентите?“ този въпрос зададохме с цел засичане на отговорите и проверка на достоверността на отговорите на 7<sup>ми</sup> въпрос. (Фиг. 9).



Фиг. 9. Разпределение на отговорите на въпрос № 7

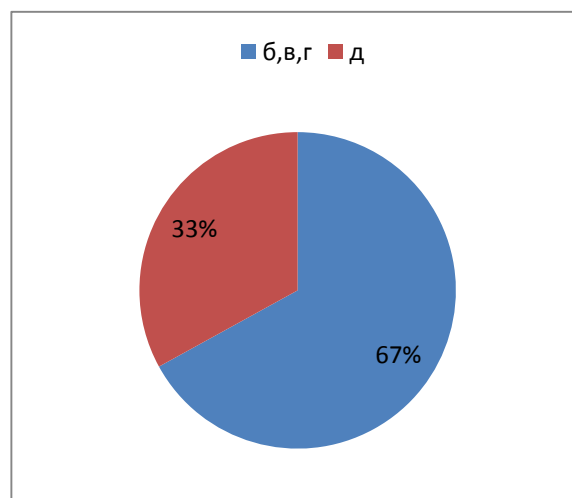
**Въпрос № 8:** „Кои от изброените сте включвали в програма за индивидуална профилактика?“ (Табл. 10, Фиг. 10, Фиг. 11).

Табл. 10. Разпределение на отговорите на въпрос № 8

Методи включвани в индивидуална програма за профилактика	Брой анкетиращи n (%)
Екзогенна флуорна профилактика, механично и химично отстраняване на плаката по зъбни повърхности като цяло (б,в,г)	18 (67%)
Екзогенна флуорна профилактика, ендогенна флуорна профилактика, механично и химично отстраняване на плаката по зъбните повърхности като цяло (д)	9 (33%)



Фиг. 10. Връзка между отговорите положително на въпрос № 6 и използваните от тях методи в индивидуалните програми за профилактика

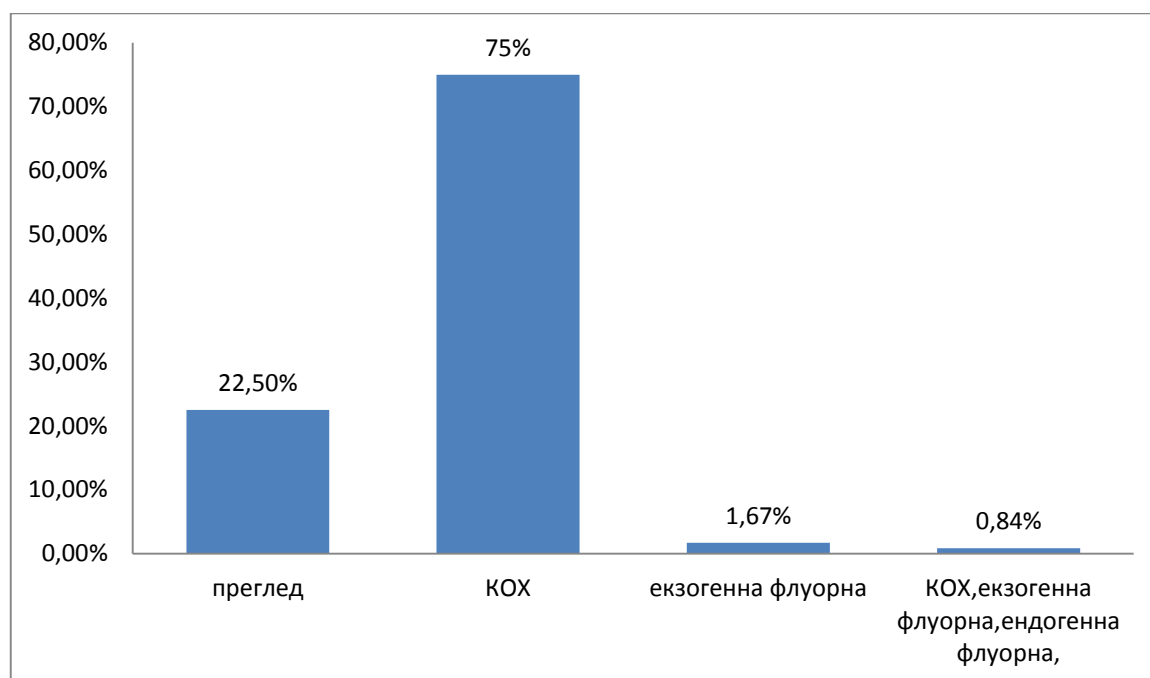


Фиг. 11. Разпределение по относителен дял на отговорите на въпрос № 8

**Въпрос № 9:** „Кое профилактично мероприятие провеждате най-често в условията на денталната Ви практика?“. (Табл. 11, Фиг. 12.)

Табл. 11. Разпределение на отговорите на въпрос № 9

Най-често клинично профилактично мероприятие	Брой анкетиращи n (%)
Ендогенна флуорна профилактика	0 (0%)
Екзогенна флуорна профилактика	2 (2%)
КОХ	90 (75%)
КОХ, Екзогенна и ендогенна флуорна профилактика	1 (1%)
Преглед	27 (22%)

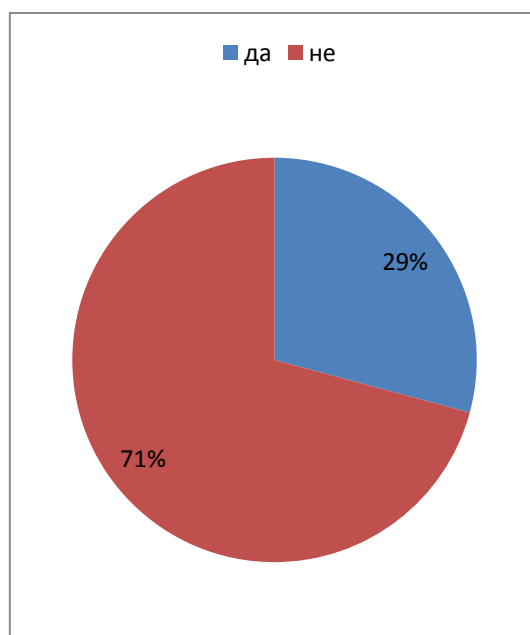


Фиг. 12. Разпределение по относителен дял на отговорите на въпрос № 9

**Въпрос № 10:** „Запознат ли сте със значението на термините Антибактериална фотодинамична терапия (АФДТ) и Бактериална дезинфекция? “ (Табл. 12, Фиг. 13.)

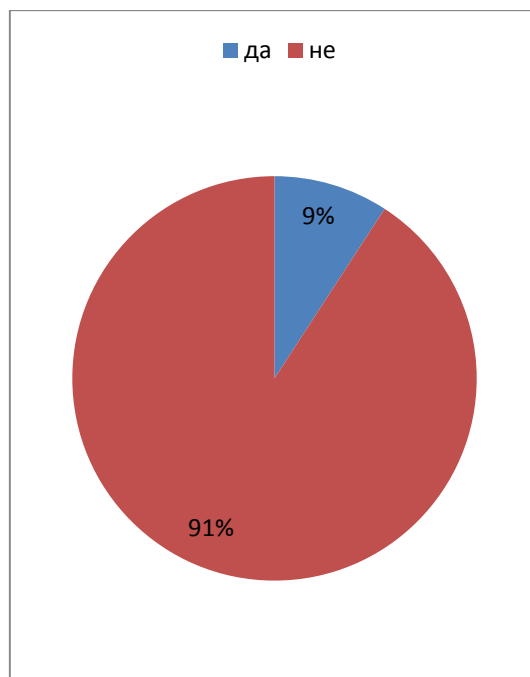
Табл. 12. Разпределение на отговорите на въпрос № 10

Запознати ли сте със значението на термините АФДТ, фотодинамична дезинфекция	Брой анкетиращи n (%)
да	35 (29%)
не	85 (71%)



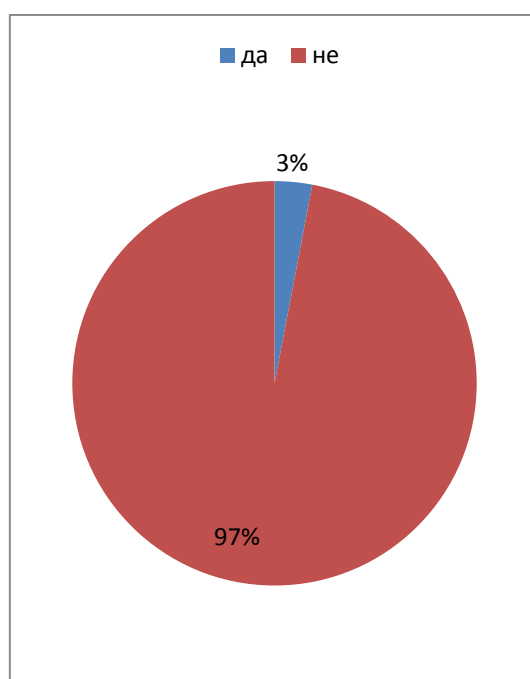
Фиг. 13. Разпределение по относителен дял на отговорите на въпрос № 10

**Въпрос №11:** „Знаете ли, че АФДТ е една от съвременните алтернативи на конвенционалното антимикробно лечение, с основно предимство липса на проявена все още бактериална резистентност?“ (Фиг. 14).



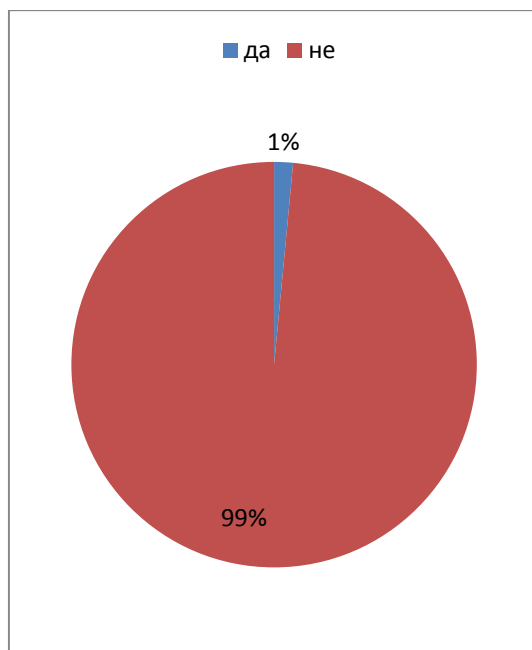
Фиг. 14. Разпределение по относителен дял на отговорите на въпрос № 11

**Въпрос № 12:** „Прилагали ли сте АФДТ при лечението на пародонтити?“ - (Фиг. 15).



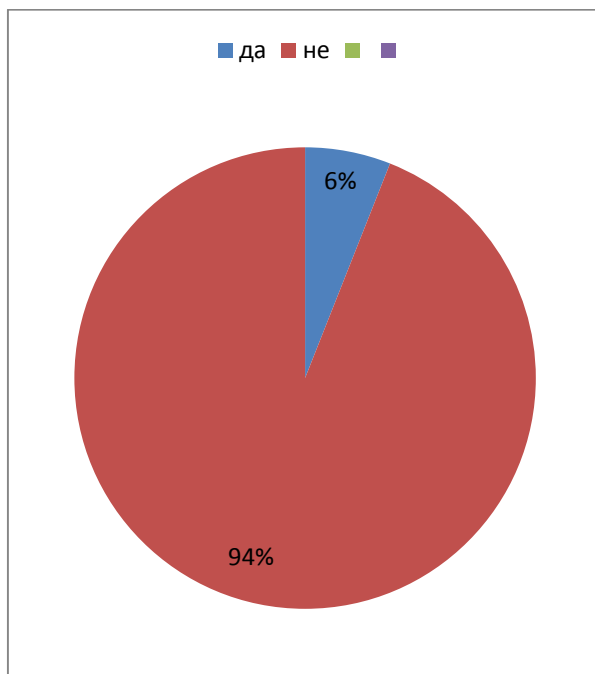
Фиг. 15. Разпределение по относителен дял на отговорите на въпрос № 12

**Въпрос № 13:** „Използвали ли сте АФДТ за дезинфекция на ендодонтското пространство при хронични периодонтити?“ (Фиг. 16).



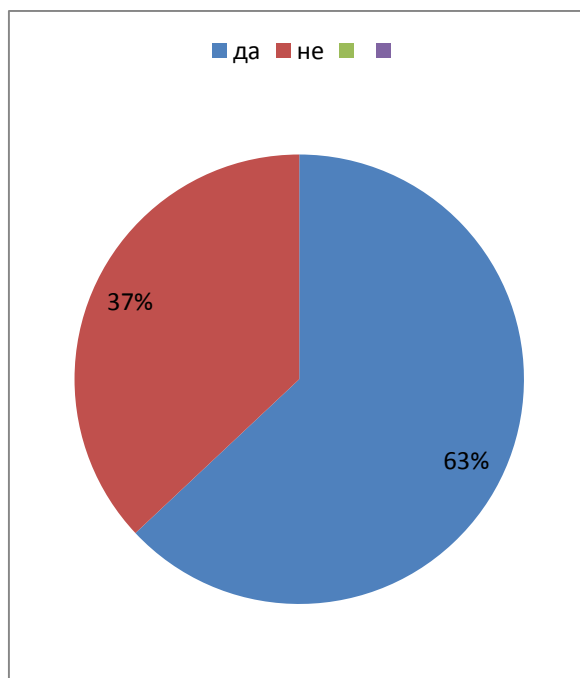
Фиг. 16. Разпределение по относителен дял на отговорите на въпрос № 13

**Въпрос № 14:** „Запознат ли сте с научни изследвания, които демонстрират ефективно и бързо унищожение на *Enterococcus faecalis* биофилми, както *in vitro* така и *in vivo*, посредством АФДТ и багрило толуидиново синьо (FotoSan®)? (Фиг. 17).



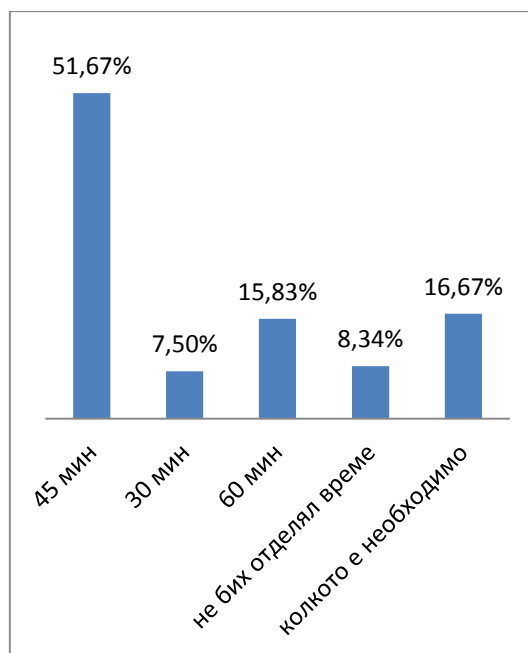
Фиг. 17. Разпределение по относителен дял на отговорите на въпрос № 14

**Въпрос № 15:** „Бихте ли въвели в практиката си методика за профилактика на зъбния кариес основана на метода на фотодинамичното редуциране на броя на *S. Мутанс*?“ (Фиг. 18).



Фиг. 18. Разпределение по относителен дял на отговорите на въпрос № 15

**Въпрос № 16:** „Колко клинично време Ви се струва удачно за провеждане на профилактични мероприятия и обучение на пациент?“ (Фиг. 19.)



Фиг. 19. Разпределение по относителен дял на отговорите на въпрос № 16



Резултати от статистическото изследване върху описаните във *цели и задачи* връзки:

▪ **Връзка 10/11**

Табл. 13. Изследване на връзката между въпрос № 10 и въпрос № 11

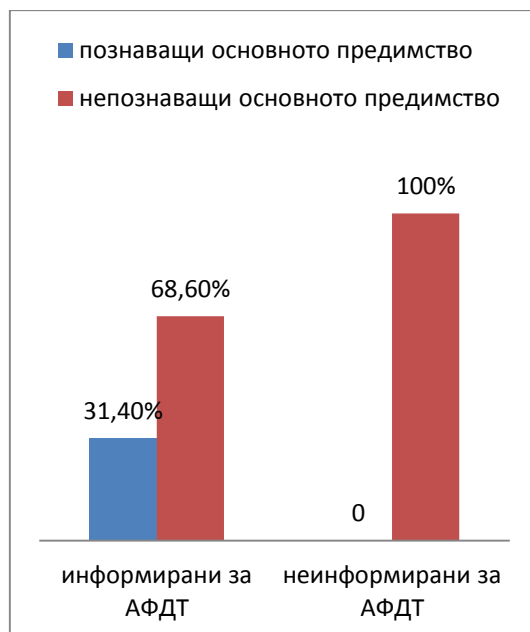
<b>11 10</b>	<b>Да n (%)</b>	<b>Не N (%)</b>	<b>Общо n (%)</b>
да	11 (31,4%)	24 (68,6%)	35 (100%)
не	0	85 (100%)	85 (100%)
Общо	11(9,2%)	109 (90,8%)	120(100%)

$\chi^2=29,42; k=1; \text{Fisher's exact test } p<0,05.$

Резултатът от статистическото изследване показва, че е налице статистически значима взаимовръзка между информираността за съществуването на АФДТ и знанието относно неговото основно преимущество - липсата на проявена бактериална резистентност (Табл. 13, Фиг. 20 и Фиг. 21).



Фиг. 20. Брой на информираните за АФДТ, спрямо брой на запознатите с основното предимство на терапията



Фиг. 21. Относителен дял на информираните за АФДТ, спрямо запознатите с основното предимство на терапията

▪ Връзка 10/12

Табл. 14. Изследване на връзката между въпрос № 10 и въпрос № 12

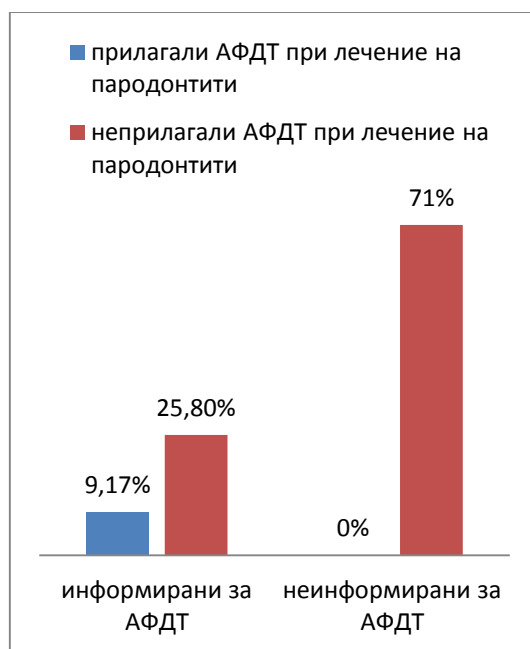
12 \ 10	Да N (%)	Не N (%)	Общо n (%)
да	4 (11,4%)	31 (88,6%)	35 (100%)
не	0	85 (100%)	85
Общо	4 (3%)	116 ( 97%)	120

$$x^2 = 10,05, K = 1, p < 0,05$$

Резултатите показват, че е налице статистически значима връзка между от разпределението на отговорилите положително или отрицателно на въпрос № 10, сравнено със разпределението на същия тип отговори, на въпрос № 12 (Табл. 14, Фиг. 22 и Фиг. 23).



Фиг. 22. Диаграма, показваща числения дял на прилагащите АФДТ при лечението на пародонтит спрямо информираните, но не прилагащи, и неинформираните и не прилагащите



Фиг. 23. Диаграма, показваща относителния дял на прилагащи АФДТ при лечението на пародонтити към всички анкетираните.

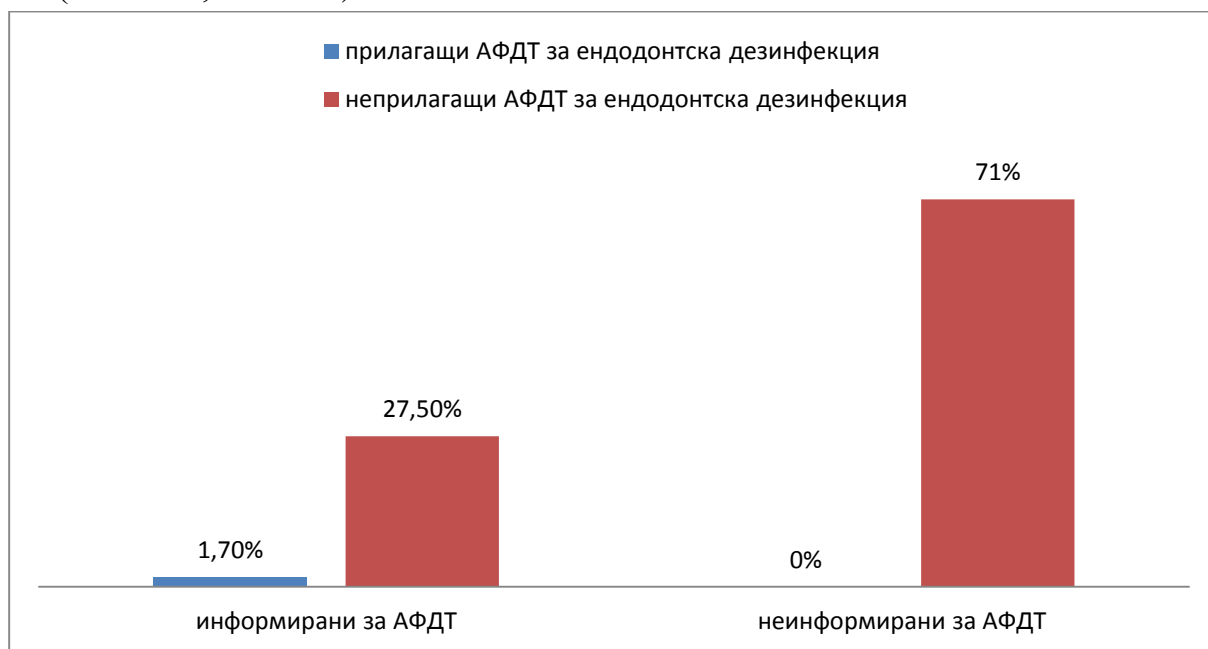
▪ **Връзка 10/13**

Табл. 15. Изследване на връзката между въпрос № 10 и въпрос № 13

13 10	Да N (%)	не n (%)	Общо n (%)
да	2 (5,7%)	33 (94,3%)	35
не	0 (100%)	85 (100%)	85
Общо	2 (1,7%)	118 (98,3%)	120

$$\chi^2 = 4,49, K=1, P < 0,05$$

Резултатите показват, че е налице статистически значима връзка между разпределението на отговорилите положително или отрицателно на въпрос № 10, сравнено със разпределението на същия тип отговори на въпрос № 13 (Табл. 15, Фиг. 24).



Фиг. 24. Диаграма, показваща относителния дял на прилагаци АФДТ за ендодонтска дезинфекция, спрямо информираните относно АФДТ

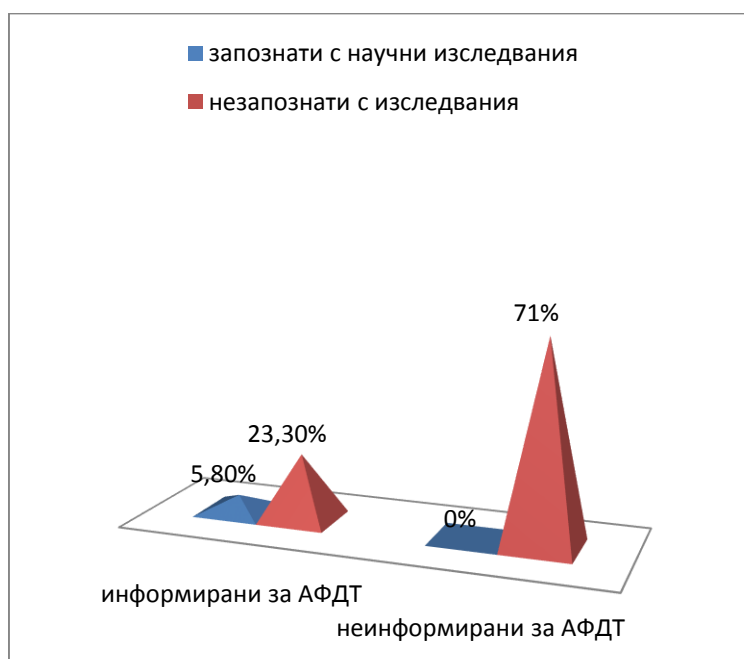
▪ **Връзка 10/14**

Табл. 16. Изследване на връзката между въпрос № 10 и въпрос № 14

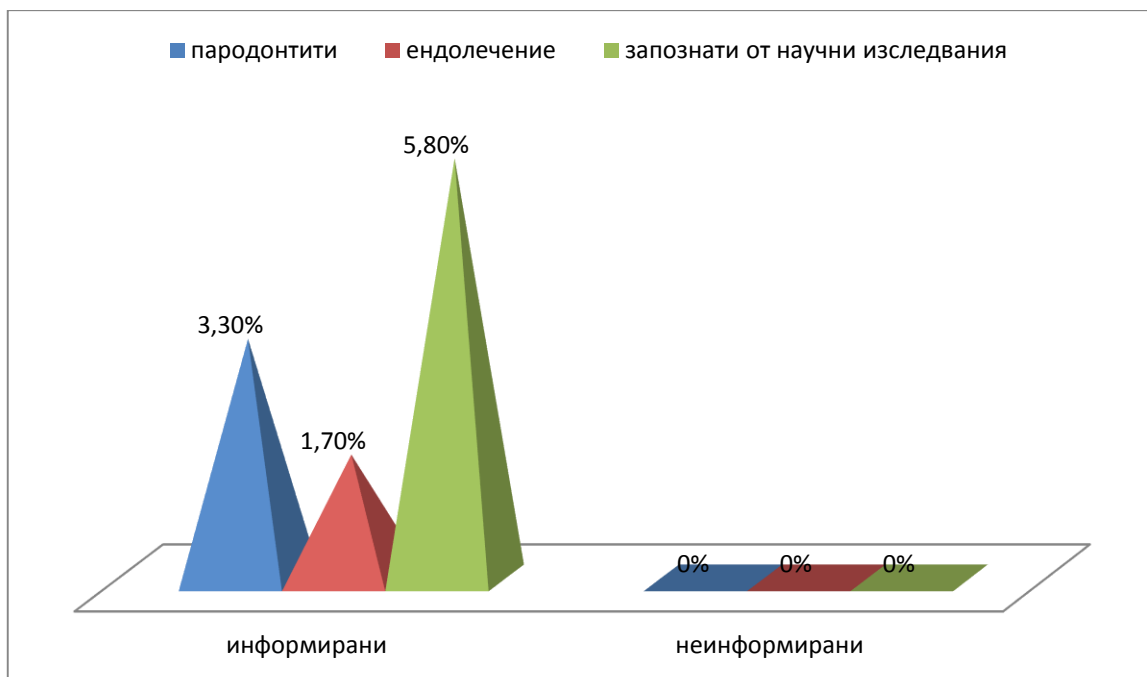
14 10	Да n (%)	Не n (%)	Общо n (%)
да	7 (20%)	28(80%)	35 (100%)
не	0 (0%)	85 (100%)	85 (100%)
Общо	7 (5,8%)	113 (94,2%)	120 (100%)

$$\chi^2 = 18,05, K= 1, P<0,05$$

Резултатите показват, че е налице статистически значима връзка между от разпределението на отговорилите положително или отрицателно на въпрос № 10, сравнено със разпределението на същия тип отговори на въпрос (Табл. 16, Фиг. 25, Фиг. 26).



Фиг. 25. Диаграма, показваща относителния дял на прилагашите АФДТ, спрямо относителния дял на информираните за АФДТ.



Фиг. 26. Диаграма, показваща относителния дял на прилагашите АФДТ и общия брой анкетирувани, разпределени спрямо информираността или не относно АФДТ.

▪ **Връзка 10/15**

Табл. 17. Изследване на връзката между въпрос № 10 и въпрос № 15

15 10	Да n (%)	Не n (%)	Общо n (%)
да	33 (94,3%)	2 (5,7%)	35 (100%)
не	44 (51,8%)	41 (48,2%)	85 (100%)
Общо	77 (64, 2%)	43 (35,8%)	120 (100%)

$$\chi^2 = 19,49, K=1, P<0,05\%$$

Резултатите показват, че е налице статистически значима връзка между разпределението на отговорилите положително или отрицателно на въпрос № 10, сравнено със разпределението на същия тип отговори на въпрос № 15 (Табл. 17, Фиг. 27).



Фиг. 27. Относителен дял на информираните за АФДТ, спрямо желаещите да въведат терапията при профилактика на зъбния кариес на възрастния пациент

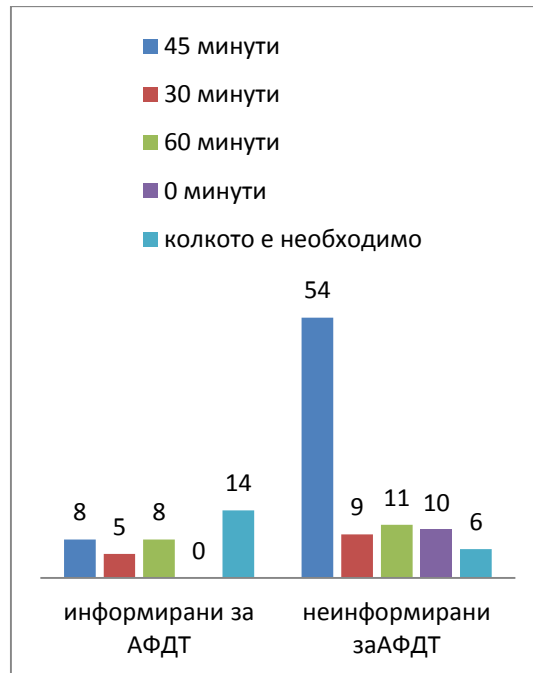
#### ▪ Връзка 10/16

Не можахме да открием статистически значима връзка между отговарящите с *да* на **Въпрос № 10** и очакваната продължителност от 45 минути до 1 час (отговори а и в). (Табл. 18, Фиг. 28 и Фиг. 29).

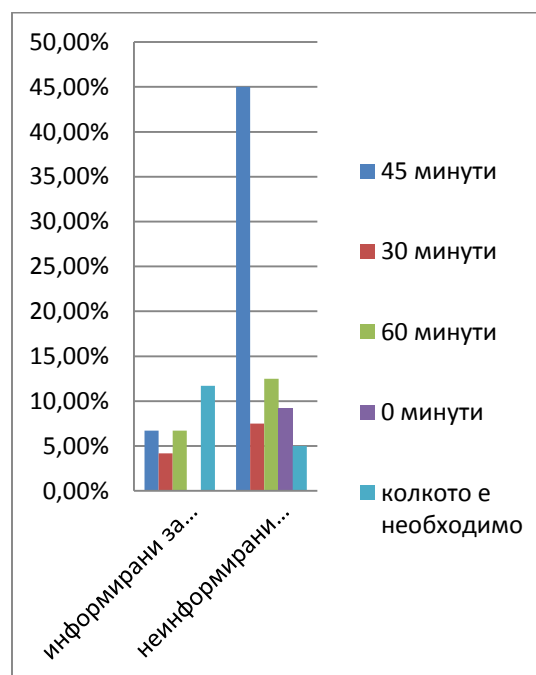
Табл. 18. Изследване на връзката между въпрос № 10 и въпрос № 16

16 \ 10	а (n%)	б (n%)	в(n%)	г (n%)	д (n%)	Общо (n%)
да	8	5	8	0	14	35
не	54	4	11	10	6	85
Общо	62	9	19	10	20	120

Т емпирично =1,3;  $p > 0,05$ .



Фиг. 28. Брой на информираните и неинформираните за АФДТ, разпределени по продължителност на очаквано клинично профилактично време



Фиг. 29. Относителен дял на информираните и неинформираните за АФДТ, разпределени по продължителност на очаквано клинично профилактично време



▪ **Връзка 3/15**

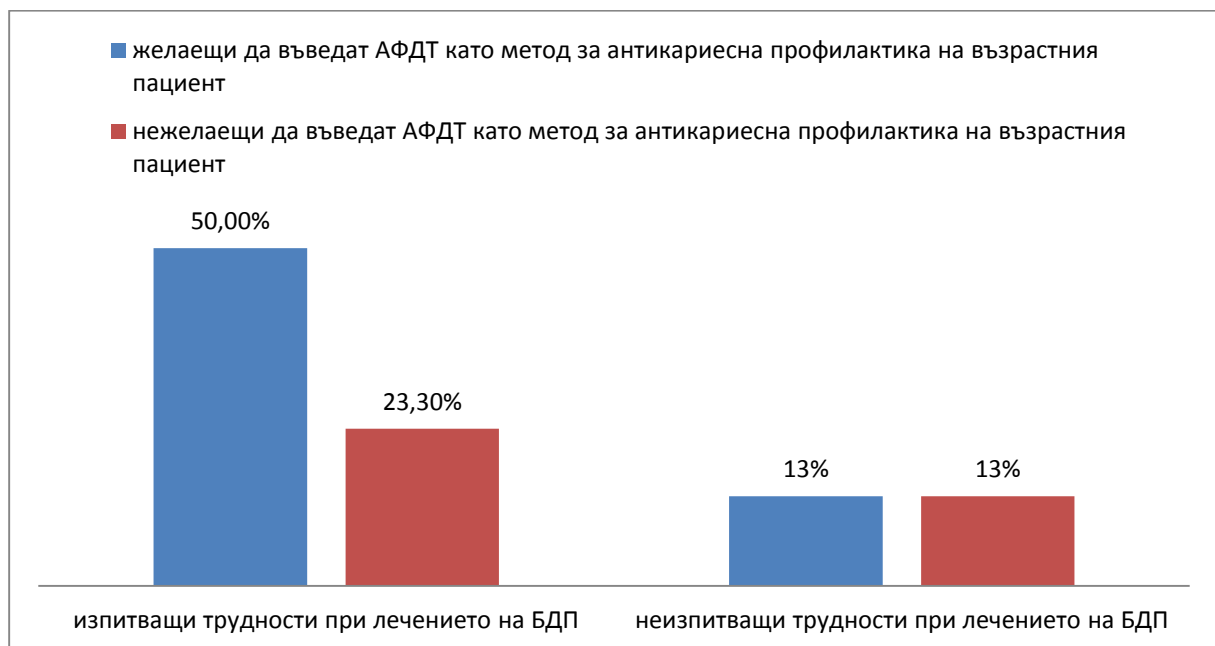
На Табл. 19 и Фиг. 30 са представени взаимовръзката между въпрос № 3 и въпрос № 15.

Табл. 19. Изследване на връзката между въпрос № 3 и въпрос № 15

15 3	Да n (%)	Не n (%)	Общо n (%)
да	60 (68,2%)	28 (31,8%)	88 (100%)
не	16 (50%)	16 (50%)	32 (100%)
Общо	76 (63,3%)	44 (36,7%)	120 (100%)

$$\chi^2 = 3,34, K=1, P>0,05$$

Резултатите показват, че не е налице статистически значима връзка между затрудняващите се при диагнозата и лечението на БДЛ и желанието за въвеждане на АФДТ като иновативен допълващ метод за кариес-профилактика.



Фиг. 30. Диаграма, показваща липсата на сигнификантна връзка при разпределението на отговорите на въпрос № 3 и тези на въпрос № 15

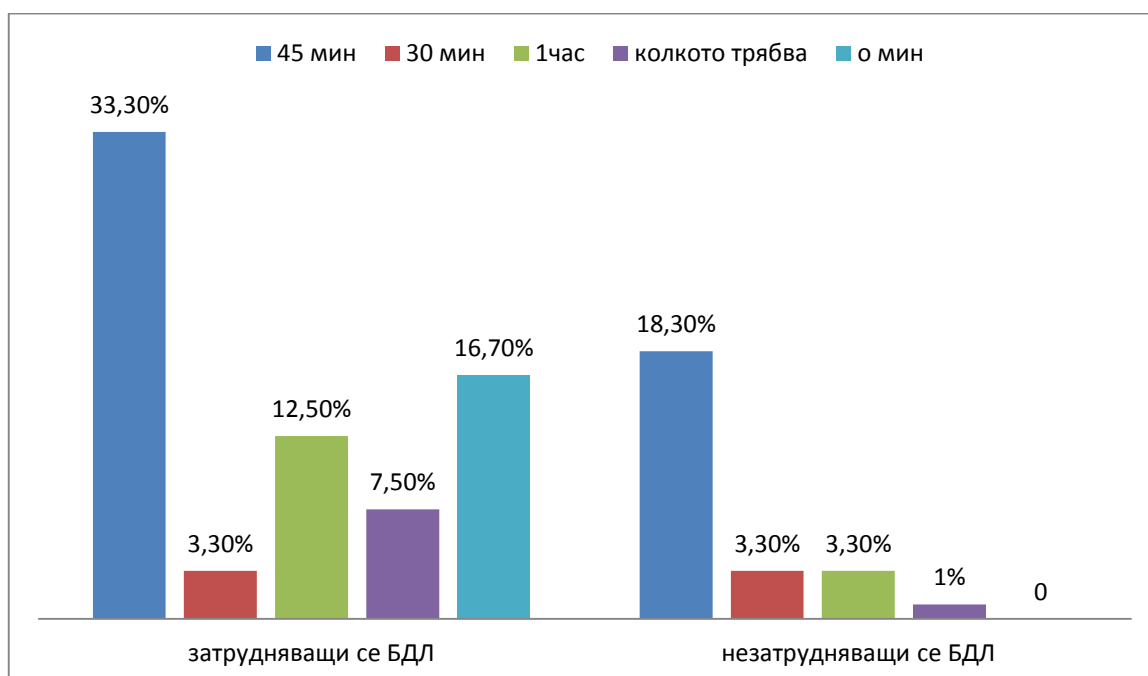
▪ **Връзка 3/16**

Изследвахме и отново връзката между отговорите на въпрос № 3 и разпределението на тези отговори спрямо очакваната продължителност на клинично-профилактичното мероприятие (Табл. 20, Фиг. 31).

Табл. 20. Изследване на връзката между въпрос № 3 и въпрос № 16

16 3	А n(%)	Б n (%)	В n (%)	Г n (%)	Д n (%)	Общо n (%)
Да	40 (45,5%)	4 (4,5%)	15 (17%)	9 (10,3%)	20 (22,7%)	88 (100%)
Не	22 (68,7%)	5 (15,6%)	4 (12,5%)	1(3,1%)	0 (0%)	32 (100%)
Общо	62 (52%)	9 (7,5%)	19 (15,8%)	10 (8,3%)	20 (16,7%)	120 (100%)

Резултатите показват, че е налице статистически значима връзка между от разпределението на отговорилите положително/отрицателно на въпрос № 3, сравнено със разпределението на отговорите (б) и (в) и (д) на въпрос № 16. Статистически закономерно затрудняващите се отговарят предимно с а, в, д, докато незатрудняващите се изключват отговор д.



Фиг. 31. Статистически значима връзка между отговорите на въпрос № 3 и тези на въпрос № 16

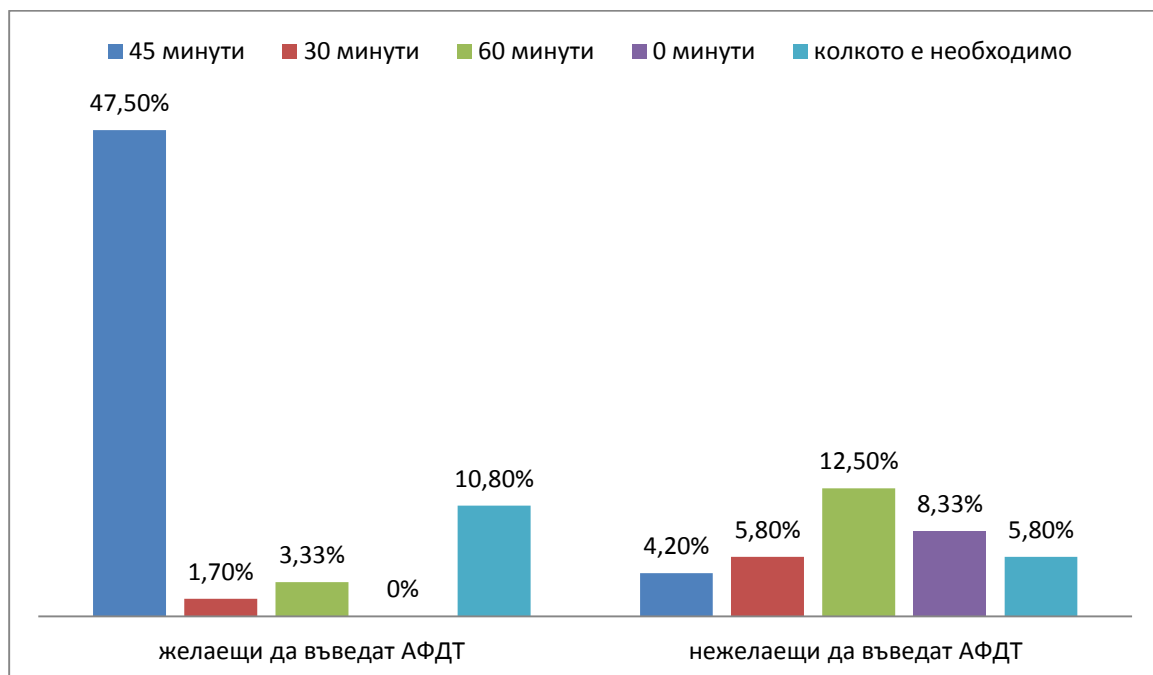
▪ **Връзка 15/16**

Съществува статистически значима връзка между разпределението на отговорите с *да* и *не* на въпрос № 15 и очакванията относно продължителността на клиничния протокол (Табл. 21, Фиг. 32).

Табл. 21. Изследване на връзката между въпрос № 15 и въпрос № 16

<b>16 15</b>	<b>а н (%)</b>	<b>б н (%)</b>	<b>в н (%)</b>	<b>г н (%)</b>	<b>д н (%)</b>	<b>Общо</b>
да	57 (75%)	2 (2,63%)	4 (5,26%)	0 (0%)	13 (16,9%)	76 (100%)
не	5 (11,4%)	7 (15,9%)	15 (13,1%)	10 (22,72%)	7 (15,9%)	44 (100%)
Общо	62 (51,7%)	9 (7,5%)	19 (15,8%)	10 (8,3%)	20 (16,7%)	120 (100%)

$$\chi^2 = 54,87, K = 4, P < 0,05$$



Фиг. 32. Диаграма, илюстрираща връзката между относителния дял на желаещите да въведат в практиката си АФДТ (въпрос № 15) и разпределението на отговорите относно продължителността на клиничния протокол (въпрос № 16)

## 1.1. Обсъждане на резултатите от анкетата

**Основните проблеми, които идентифицираме в настоящата анкета са:**

1. Наличие на търсене и желание от пациентите на профилактични грижи и несъответстващото на това търсене, ангажиране на денталните медици в провеждането на индивидуално-ориентирана кариес-профилактика.

2. Недостатъчната информираност и знание относно метода на АФДТ и конкретно, при лечението на орални заболявания.

3. Изключително малък относителен дял на прилагащите АФДТ при лечение на пародонтити и хронични периодонтити.

4. Наличието на диагностични и лечебни трудности при третирането на обратимото състояние на първичен ранен стадий на кариес на емайла.

**Формулираните хипотези са следните:**

1. Нивото на профилактични грижи при възрастните пациенти засягащи превенцията от кариес е недостатъчно.

2. Съществува непознаване на метода на АФДТ, но има интерес и желание за прилагането му в практиката.

3. Продължителността на профилактични мероприятия в условията на клиничната практика се очаква да е или леко да надхвърля *45 минути*.

Индивидуалната профилактична програма е част от протокола при лечението на зъбния кариес като заболяване; препарирането на кавитети, грижата за дентинната рана и obtурирането с алопластичен материал е друга част от протокола, която обединява в себе си както превантивния, така и хирургичния традиционен подход в медицината. Единият без другия елемент води до неуспех на лечението на заболяването зъбен кариес. Процентът вторични кариеси открити годишно, процентът подменени obtурации поради вторичен кариес или поправени такива са доказателство в широк мащаб на този извод направен косвено от анкетата.

На **Въпрос № 6**, 78% от анкетираните зъболекари отговарят, че никога не са изготвяли подобна програма. Да припомним, че 93% са

провеждали преглед поне на 5-ма пациенти месечно, търсеци активно профилактика. Сред анкетиранияте има 7 колеги със специалност или специализиращи *Оперативно зъболечение и ендодонтия* и 10 - *Детска дентална медицина*. Това са специалностите най-пряко свързани с кариес-профилактиката. Вероятно причините за тези резултати са:

- Непревантивен приоритет на практиката – протетична и хирургична насоченост.
- Липсата на клинично време.
- Непознаване възможностите на превенцията.
- Подценяване на етиологичните причини за зъбен кариес.
- Несигурност и недоверие към съществуващите методи за превенция.

Ако трябва да се избере и посочи едно профилактично клинично мероприятие, най-често осъществявано в условията на практиката им, 22% от анкетиранияте отговарят *профилактичен преглед*. *Condition sine qua non*, безспорно, всичко започва от прегледа както при лечението така и при профилактиката, но както при лечението така и при профилактиката не би трябвало да свърши там, тъй като ще се получи единствено констатация за даден феномен. Няма да има реално осъществяване на профилактични грижи.

Информиранияте за съществуването на алтернатива на конвенционалните антибиотици в определени области на медицината, известно като АФДТ се оказаха 29%-ов дял. Големият процент отрицателни отговори, (71%) се дължат на клинично ориентираното професионално битие на денталните лекари, за повечето от които, съвсем естествено, е важен не толкова процесът на научно натрупване на съобщения и информация относно даден феномен, колкото моментът на въвеждането на конкретни препоръки, протокол и уред за клинично приложение на новостите, базирани на определена критична маса от научни теории и доказателства.

От отговорите на **въпрос № 15** се разбира, че голям процент (62%) са готови да въведат АФДТ като допълващ метод за кариес-профилактика.

Повечето дентални лекари, независимо дали с придобита или не специалност, работят и като общо практикуващи и се стремят да разширяват асортимента от дентални услуги осъществявани от тяхната дентална практика.

Трябва да се предложи адекватна на очакваната от колегите продължителност на методиката, както и подходящ сравнително икономически изгоден уред както за клинична, така и за домашна употреба.

От разпределението на отговорите на **въпрос № 16** личи, че най-висок процент колеги биха отделяли 45 минути за профилактика и считаме, че действително практиката показва като най-разумното отделяне на време на пациент между 40-50 минути.

### **Заклучение**

От направената анкета личи потребността от профилактика както на ниво пациент, така и на ниво лекар. Съществува нагласа сред пациентите в посока профилактика, а от страна на лекарите готовност да въведат нов метод, който е приемлив финансово и не е времеконсумиращ. Необходима е целенасочена работа за информирание относно възможностите на метода на АФДТ в областта както на оралното здраве и профилактика, така и конкретно за редуциране на кариогенните микроорганизми. Необходими са още клинични изследвания за внедряване на фотодинамичната дезинфекция на ТЗТ и на устната кухина, както и на апарат за индивидуална профилактика. Съгласни сме с мнението на *Ichinose-Tsuno et al.* (2014 г), че не е далеч времето, когато денталните кабинети ще са снабдени с апарати за редуциране на биофилма, базирани на АФДТ, а личната орална хигиена ще е подпомогната от зъбни пасти, съдържащи фотосенсибилизатор и от четки за зъби с LED светлина.

Желанието ни е на *везните на реалността* (Фиг. 33), да се редуцира броят на тухлите разположени в дясно, а вляво *да натезжат* с добавянето на нова тухла - АФДТ за кариес-профилактика (Фиг. 34).



Фиг. 33. Везни на реалността относно кариесната профилактика на възрастния пациент



Фиг. 34. Везни на реалността, подпомогната от АФДТ

**2. Резултати от втора задача** - изследване *ин vitro* на антимикробния ефект на фотосенсибилизатори, разрешени за клинично приложение (метиленово синьо, ФотоСан<sup>®</sup>) и създадените в нашата страна металфталоцианини (Zn-, Si-, Ga-фталоцианин) върху лабораторни, референтни щамове на *Streptococcus mutans*.

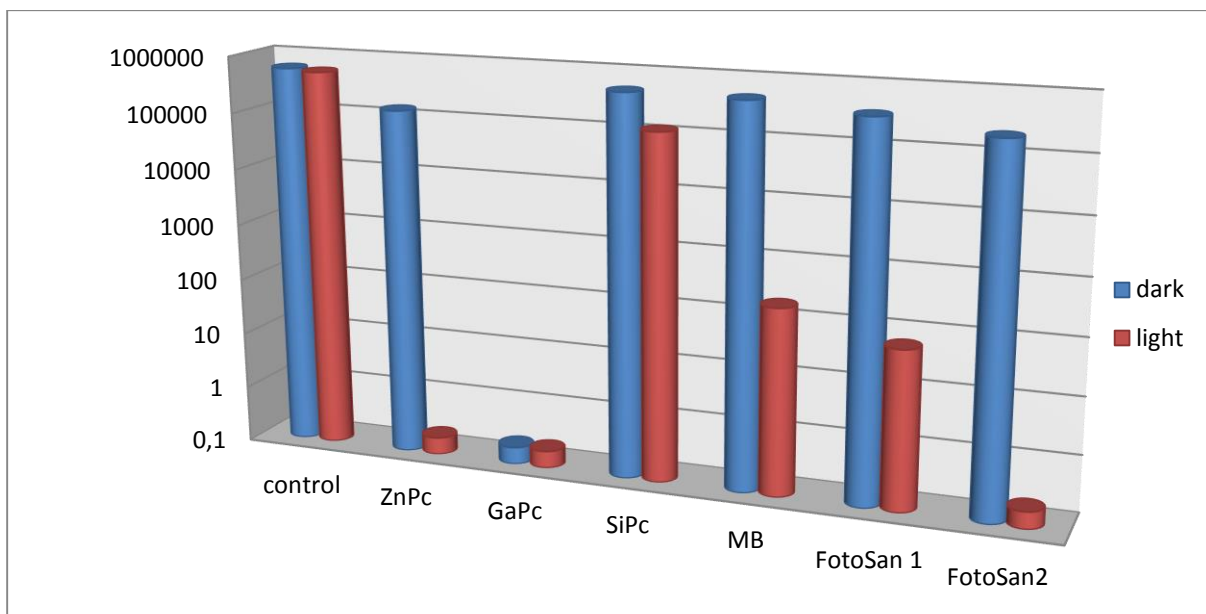
Резултатите са представени на Табл. 22 и Фиг. 35.

Табл. 22. Фотодинамично инактивиране на *Streptococcus mutans* лабораторен референтен щам.

ФОТОДИНАМИЧНО ИНАКТИВИРАНЕ НА <i>Streptococcus mutans</i>							
Брой преживели бактерии (КОЕ/мл) /X средно ± SD/							
Трети-ране	Фотосенсибилизатори						
	Контрола бактерии	ZnPc	GaPc	SiPc	MB	FotoSan 1	FotoSan2
ТЪМНО	(5.9±0.71) x10 <sup>5</sup>	(1.4±0.28) x10 <sup>5</sup>	0	(5.0±0.28) x10 <sup>5</sup>	(4.8±0.88) x10 <sup>5</sup>	(3.5±2.32)x 10 <sup>5</sup>	(2.1±0.41) x10 <sup>5</sup>
Светло	(5.4±0.36) x10 <sup>5</sup> p=0.29	0 p=0.019	0	(1.2±0.17) x10 <sup>5</sup> p=0.003	(1.9±0.63) x10 <sup>2</sup> p=0.005	(6.2±2.4) x10 <sup>1</sup> p=0.01	0 p= 0.006

Статистически достоверна е разликата при  $p < 0.05$ .

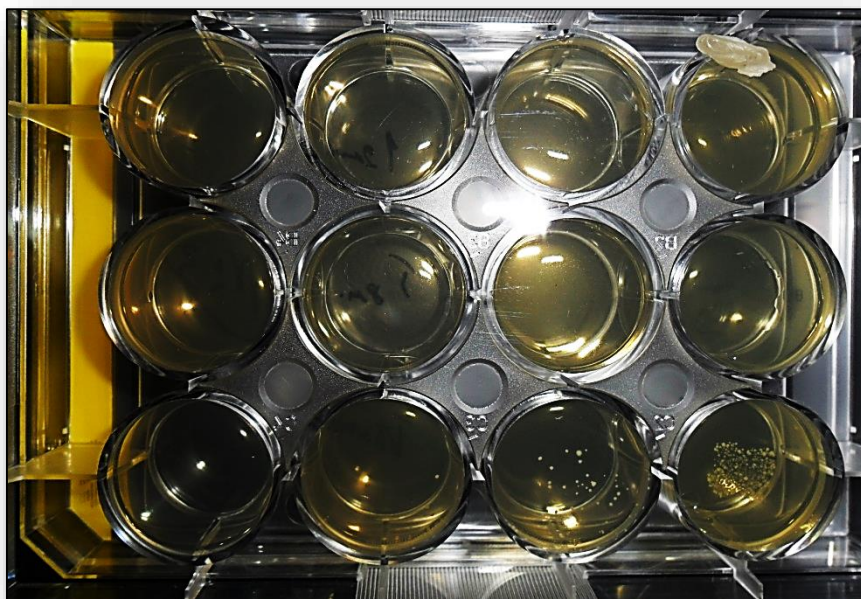




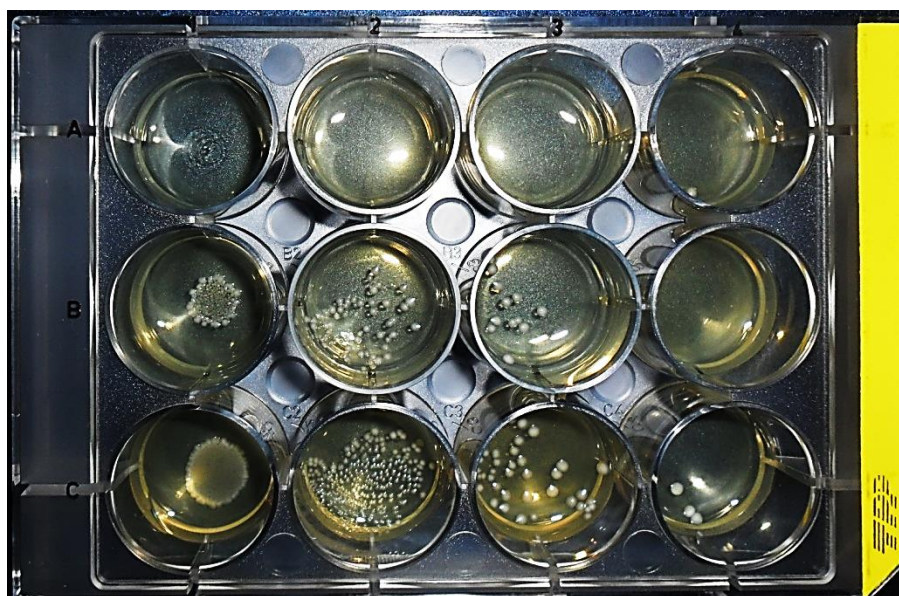
Фиг. 35. Диаграма, илюстрираща фотодинамичната инактивация на *Streptococcus mutans* с Zn-фталоцианин (5,6 $\mu$ M), Ga-фталоцианин (5,6 $\mu$ M), Si-фталоцианин (5,6 $\mu$ M), МС (145 $\mu$ M), ФотоСан 1 (34 $\mu$ M), and ФотоСан 2 (136 $\mu$ M).

Фотодинамичният антибактериален ефект при петте тествани вещества е както следва:

- **Zn-фталоцианин 5,6 $\mu$ M** - пълна фотоинактивация на бактериите-статистически незначителен брой или пълна липса на CFU/ml. (100%) (Фиг. 37).
- **Si-фталоцианин 5,6 $\mu$ M** - фотоинактивация в рамките на редукция на 1 лог CFU/ml (10%) (Фиг. 39).
- **Ga-фталоцианин 5,6 $\mu$ M** - пълна тъмнинна токсичност - 5 лог CFU/ml, не може да се отчете фототоксичност (Фиг. 36).
- **Метиленово Синьо 145 $\mu$ M** - фотоинактивация изразяваща се в 4 лог CFU/ml - (99,99%).
- **ФотоСан 1 (34 $\mu$ M)** - 3,5 лог намаление на броя на CFU/ml (98%).
- **Фотосан 2 (136 $\mu$ M)** - наблюдава се ефект на пълна фотоинактивация (100%) (Фиг. 38).



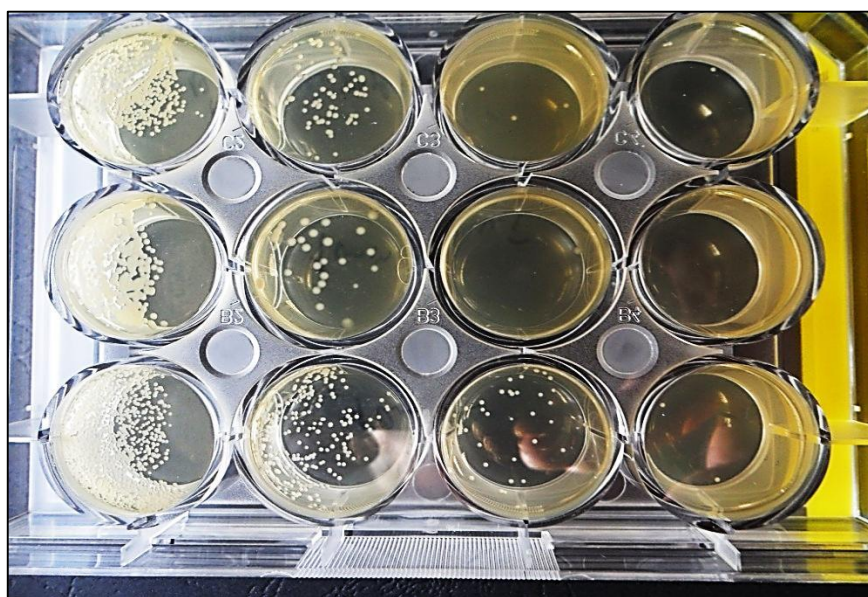
Фиг. 36. Тъмнинна токсичност на Ga-фталоцианин



Фиг. 37. Пълна фотинактивация с Zn-фталоцианин



Фиг. 38. Пълна фотинактивация с Фотосан 2



Фиг. 39. Фотоинактивация в рамките на 1 лог, с Si-фталоцианин



Фиг. 40. Контролна бактериална суспензия без светлина, без фотосенсибилизатор *Streptococcus mutans* - лабораторен референтен щам

## 2.1. Обсъждане на резултатите от втора задача

Фотодинамичната инактивация на МО зависи от химичната структура на веществото-фотосенсибилизатор и това, както и количеството генериран синглетен кислород *in cito*, което пък е функция от химичната структура, представляват критичния елемент в фотодинамичната дезинфекция.

Наличието на тъмнинна токсичност е нежелано явление, което демонстрира, че веществото само по себе си, без допълнително светлинно активиране, има бактерициден ефект.

Тъй като фотосенсибилизаторът се натрупва както в клетки на макроорганизма, така и в прицелни клетки-микробни, а фотооксидацията е по-увреждаща за бактериалните, то за постигане на желан ефект, без търсено разрушаване на клетъчни елементи е необходимо веществото само по себе си да не се активира. Това ще гарантира, че здрави клетки от тъканите на макроорганизма няма да бъдат или ще бъдат минимално засегнати. От тестваните от нас фотосенсибилизатори, в избраните концентрации, сериозна тъмнинна токсичност прояви единствено Ga-

фталоцианин - 100% инактивиране при липса на светлина. Същото докладват и *Мантарева и сътр.*

Незначителната тъмнинна токсичност установена при Zn-фталоцианин и ФотоСан 2 (136µM) съпоставена с отличната фотинактивация - 100%, е основание да приемем тази концентрация и пониска от нея, за подходящи при провеждане на следващите експерименти, целящи да установят чувствителността на клинично изолиран щам на *Streptococcus mutans*. Резултатите са съпоставими с докладваните от *Rolim et al.* за 3 лог редуциране на CFU/ml при използване на LED източник и ТС 136µM. Получените от нас резултати потвърждават съобщените от *Mantareva et al.* и *Angelov et al.* относно ефективността на 2, 9, 16, 23-tetrakis (3-methylpyridyloxy) phthalocyanine zinc за пълно фотоинктивиране на орални патогени, включително и на *S. mutans*.

Липсата на тъмнинна токсичност, паралелно с достатъчното фотодинамично фотоинктивиране при използването на ФотоСан 1(34µM ТС), Метиленово синьо-145µM, ги определят като потенциални фотосенсибилизатори в методика за профилактика на зъбен кариес основана на АФДТ. *Bevilacqua et al.* (30), *Hakimiha et al.* и *Williams et al.* установяват чувствителност на лабораторен щам планктонни клетки на *S.mutans* при третиране с 50µM ТС от порядъка на 4 до 7 лог редуция на CFU/ml и използване на LED източник.

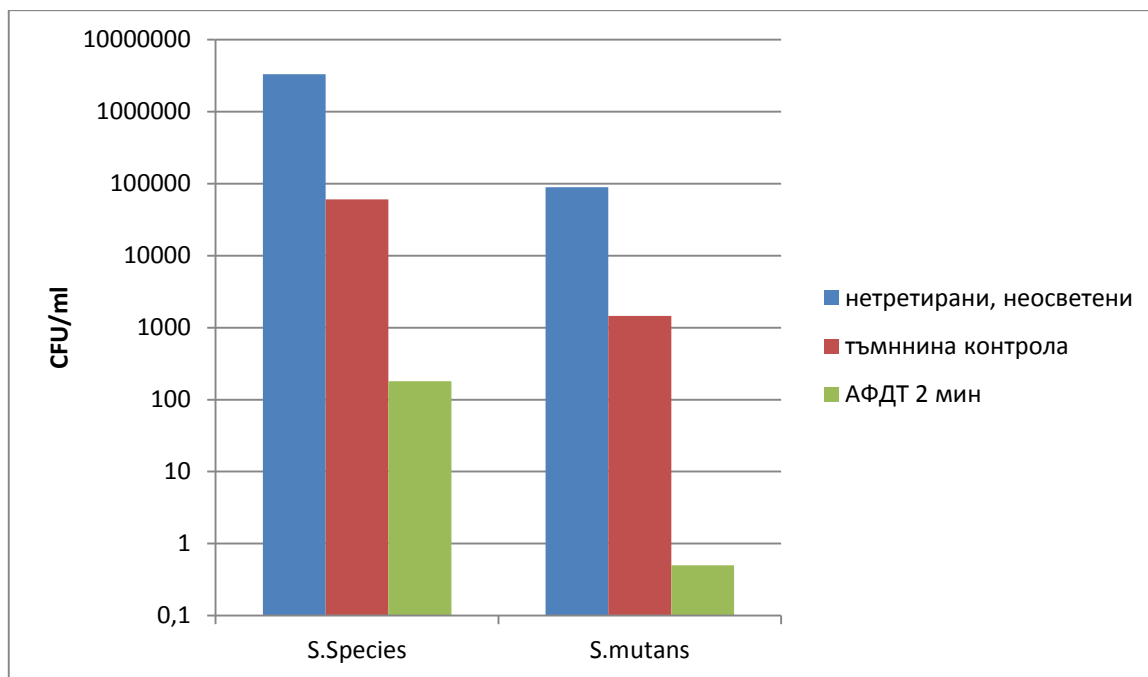
Толуидиновото синьо, (активна съставка на ФС®) може да дифундира през бактериалните мембрани, понеже има по-голям коефициент на трансмембранна проникваемост от редица други багрила. Багрилата използвани като фотосенсибилизатори имат различен афинитет към клетъчната мембрана и различни вътреклетъчни бактериални структури. Тази разлика е функция на физико-химичната им характеристика и обусловените от нея параметри като молекулно тегло и коефициент на разделяне *P*. Публикуваните от *Rolim et al.* резултати относно липсата на бактерициден фотодинамичен ефект върху *S.mutans* лабораторен щам при използване на МС са получени от експеримент проведен с 5 минути тъмнинно инкубиране. Считаме, че докладваният от нас резултат на редуциране с 3,5 лог CFU/ml е свързан с трикратното увеличаване на времето за тъмнинното инкубиране (15 мин) и увеличаване на количеството ФС натрупан вътреклетъчно.

**3. Резултати от трета задача - проучване *in vitro* на антимикробния ефект на разрешения за клинично приложение фотосенсибилизатор ФотоСан<sup>®</sup> и създаденият в нашата страна Zn- фталоцианин, върху клинично изолирани от зъбна плака МО - *Streptococcus mutans* и *Streptococci species* (Фиг. 41, Фиг. 42).**

На Табл. 23 и Фиг. 43 са показани резултатите от фотоинактивация на клинично изолирани *Streptococcus mutans* и *Streptococci species* при третиране с 180  $\mu\text{M}$  ФС<sup>®</sup> (Фиг. 49 и Фиг. 53). На Табл. 24 са систематизирани резултатите от проведената *in vitro* АФДТ върху *S. species* с различни концентрации ФС при два различни времеви интервала на светлинно облъчване (Фиг. 44).

Табл. 23. Фотоинактивация на *S.mutans* и *S. species* с фотосенсибилизатор ФС<sup>®</sup> 180 $\mu\text{M}$

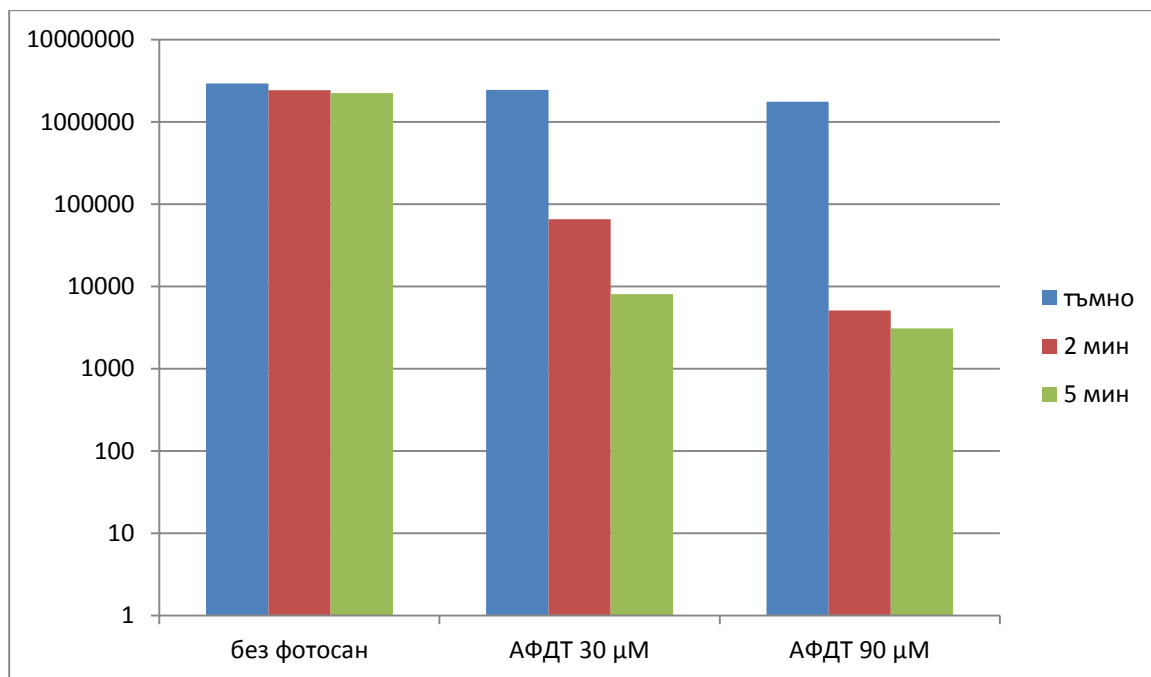
Третиране	Брой преживели бактерии (КОЕ.мл <sup>-1</sup> /Xcp $\pm$ SD/)	
	<i>Streptococcus species</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
1. Нетретирани с ФС бактерии, неосветени (група 1)	(3.32 $\pm$ 1.37) x 10 <sup>6</sup>	(8.95 $\pm$ 1.78) x 10 <sup>4</sup>
2. Третирани с ФС бактерии, неосветени (група 2)	(6.03 $\pm$ 1.47) x 10 <sup>4</sup> p 2-1= 0.00001 p 2-3= 0.014	(1.46 $\pm$ 0.96) x 10 <sup>3</sup> p 2-1 = 0.019 p 2-3= 0.00002
3. Третирани с ФС бактерии, осветени 2 мин (група 3)	(1.80 $\pm$ 0.96) x 10 <sup>2</sup> p 3-1 = 0.0003 p 3-2 = 0.00001	0 p 3-1 = 0.0001 p 3-2 = 0.019



Фиг. 43. Графика, отразяваща броя жизнеспособни клетки *Streptococcus mutans*, *Streptococci species* CFU/ml, тъмнинни и светлинни контроли и третиране клетки - ФС® 180µМ

Табл. 24. Фотоинактивация на *Streptococcus species* в CFU/ml и контроли, при третиране с 30, 90µМ ФС®

Светлинно въздействие	Брой преживели бактерии <i>Streptococcus species</i> (КОЕ.мл <sup>-1</sup> /Xcp ± SD/)		
	Бактерии без Фотосан	Третирани с 30µМ Фотосан	Третирани с 90µМ Фотосан
1. Неосветени	(2.94 ±0.62) x 10 <sup>6</sup>	(2.45 ±0.41) x 10 <sup>6</sup>	(1.76 ±0.35) x 10 <sup>6</sup>
2. Осветени 2 мин	(2.43 ±0.97) x 10 <sup>6</sup> p 2-1= 0.48	(6.60 ±1.61) x 10 <sup>4</sup> p 2-1= 0.0005	(5.10 ±1.40) x 10 <sup>3</sup> p 2-1= 0.0009
3. Осветени 5 мин	(2.24 ±0.41) x 10 <sup>6</sup> p 3-1= 0.17	(8.10 ±2.60) x 10 <sup>3</sup> p 3-1= 0.0004	(3.10 ±1.90) x 10 <sup>3</sup> p 3-1= 0.0009



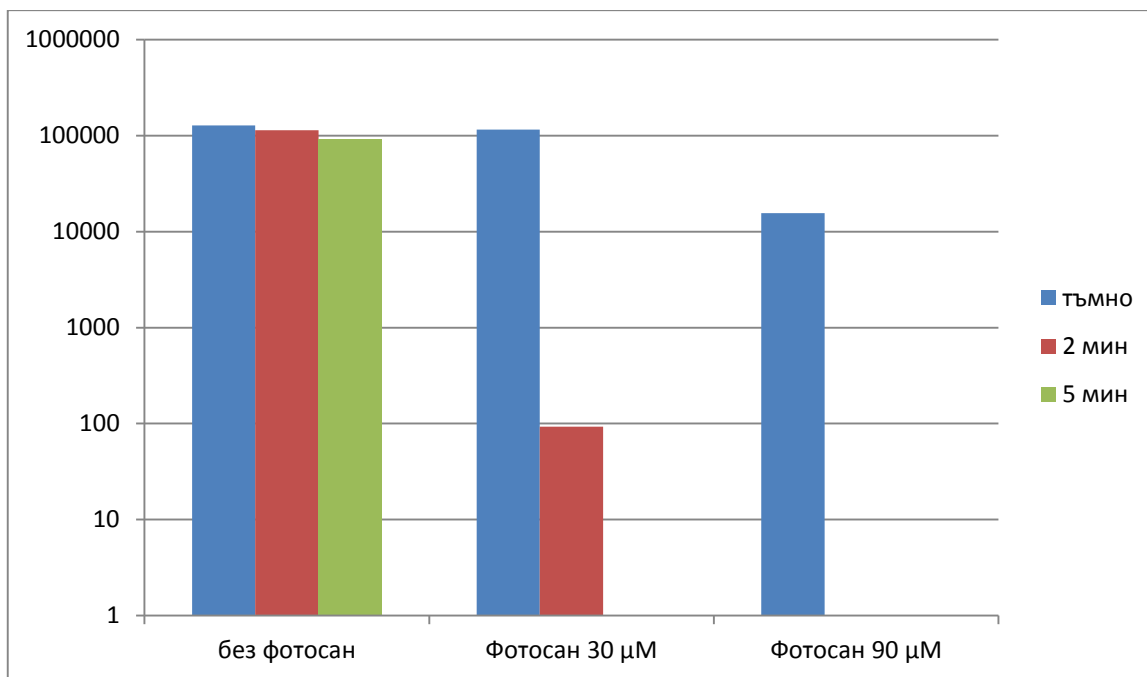
Фиг. 44. Графика, отразяваща фотоинактивация на *Streptococci species* в CFU/ml и контроли, при третиране с 30, 90μМ ФС<sup>®</sup>

На Табл. 25 и Фиг. 45 са представени резултатите от АФДТ *in vitro* върху *S. mutans* клинично изолиран щам при третиране с различни концентрации ФС<sup>®</sup> (Фиг. 48 и Фиг. 50). На Фиг. 46 е представена сравнителна диаграма относно ефекта на АФДТ *in vitro* върху *S. mutans* и *S. species*. На Табл. 26 и Фиг. 54 са представени резултатите от чувствителността към АФДТ проведена с Zn-фталоцианин 15 μМ, на *S. mutans* и *S. species*.

Табл. 25. Фотоинактивация на *Streptococcus mutans* в CFU/ml и контроли, при третиране с 30, 90μМ ФС<sup>®</sup>

Светлинно въздействие	Брой преживели бактерии <i>Streptococcus mutans</i> (КОЕ.мл <sup>-1</sup> /X <sub>ср</sub> ± SD/)		
	Бактерии без Фотосан	Третирани с 30μМ Фотосан	Третирани с 90μМ Фотосан
1. Неосветени	(1.28 ±0.28) x 10 <sup>5</sup>	(1.16 ±0.34) x 10 <sup>5</sup>	(1.56 ±0.43) x 10 <sup>4</sup>
2. Осветени 2 мин	(1.14 ±0.21) x 10 <sup>5</sup> p 2-1 = 0.52	(0.93 ±0.23) x 10 <sup>2</sup> p 2-1 = 0.004	0 p 2-1= 0.003
3. Осветени 5 мин	(0.91 ±0.18) x 10 <sup>5</sup> p 3-1= 0.12	0 p 3-1= 0.004	0 p 3-1= 0.003





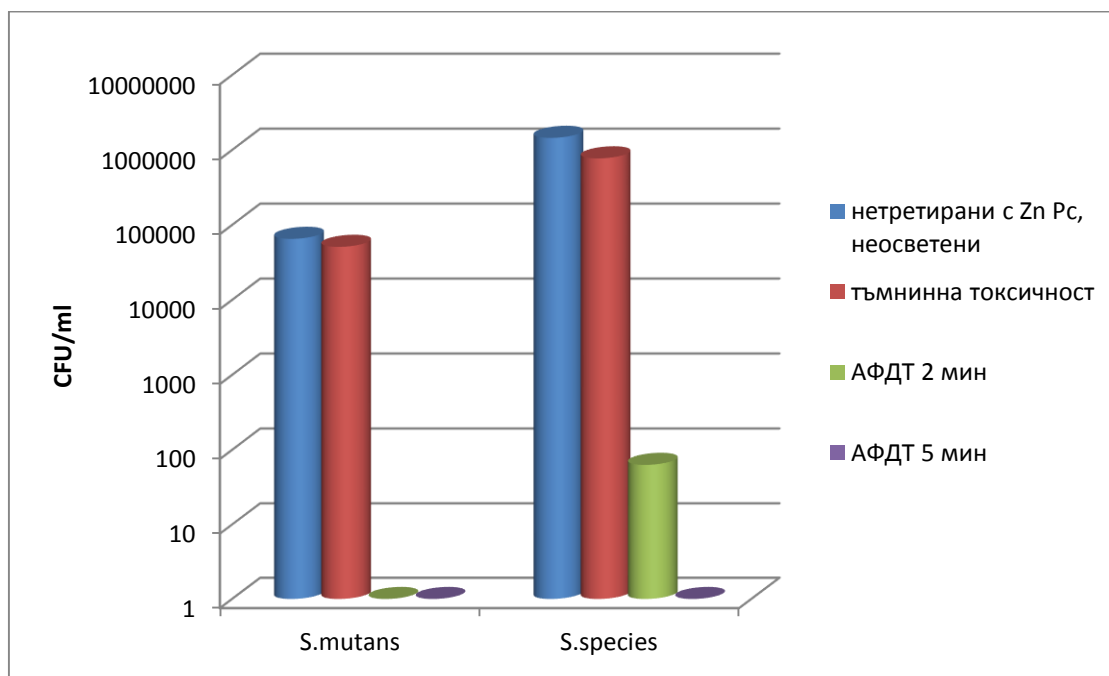
Фиг. 45. Графика, отразяваща фотоинактивация на *Streptococcus mutans* в CFU/ml и контроли, при третиране с 30, 90μM ФС®



Фиг. 46. Фотоинактивация на *Streptococci species* и *Streptococcus mutans* в CFU/ml и контроли, при третиране с 30, 90μM ФС®

Табл. 26. Резултати на АФДТ при третиране на *Streptococci species* и *Streptococcus mutans* с Zn-фталоцианин - 15 $\mu$ M.

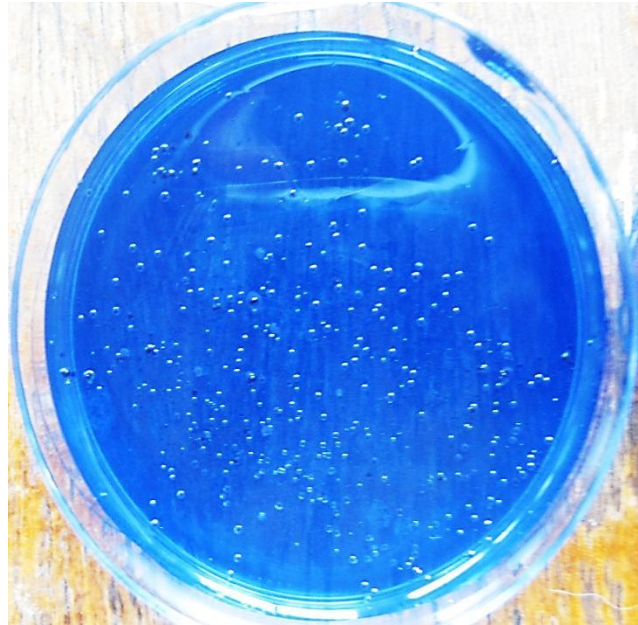
Третиране	Брой преживели бактерии (КОЕ.мл <sup>-1</sup> /X <sub>ср</sub> $\pm$ SD/)	
	<i>Streptococcus species</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
1. Нетретирани с Zn-фталоцианин, неосветени	(1.45 $\pm$ 0.66) x 10 <sup>6</sup>	(6.52 $\pm$ 2.02) x 10 <sup>4</sup>
2. Третирани с Zn-фталоцианин, неосветени	(7.72 $\pm$ 2.39) x 10 <sup>5</sup> p 2-1 = 0.1 p 2-3 = 0.002	(5.10 $\pm$ 1.19) x 10 <sup>4</sup> p 2-1 = 0.27 p 2-3 = 0.0007
3. Третирани с Zn-фталоцианин, осветени 2 мин	(6.30 $\pm$ 2.50) x 10 <sup>1</sup> p 3-1 = 0.01 p 3-2 = 0.002	0 p 3-1 = 0.002 p 3-2 = 0.0007
4. Третирани с Zn-фталоцианин, осветени 5 мин	0 p 4-1 = 0.01 p 4-2 = 0.002	0 p 4-1 = 0.002 p 4-2 = 0.0007



Фиг. 47. Резултати на АФДТ при третиране на *Streptococci species* и *Streptococcus mutans* с Zn-фталоцианин -15 $\mu$ M

Забележка: За резултатите представени в Табл. 23, 24, 25, 26 важи:

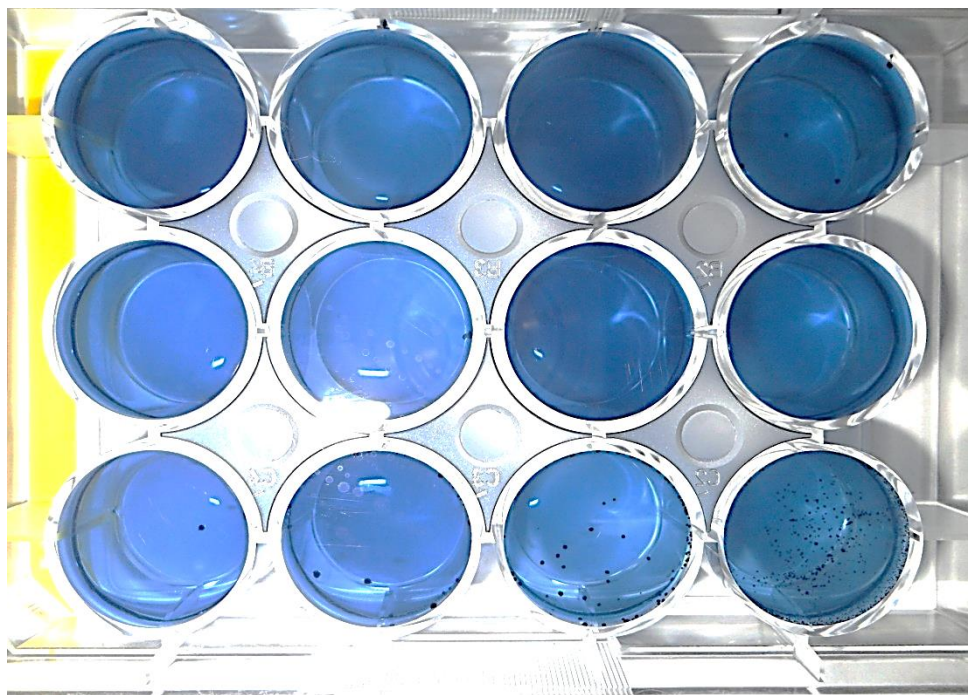
- **SD** - standart deviation (стандартно отклонение)
- Значими са различията при  $p < 0.05$ .



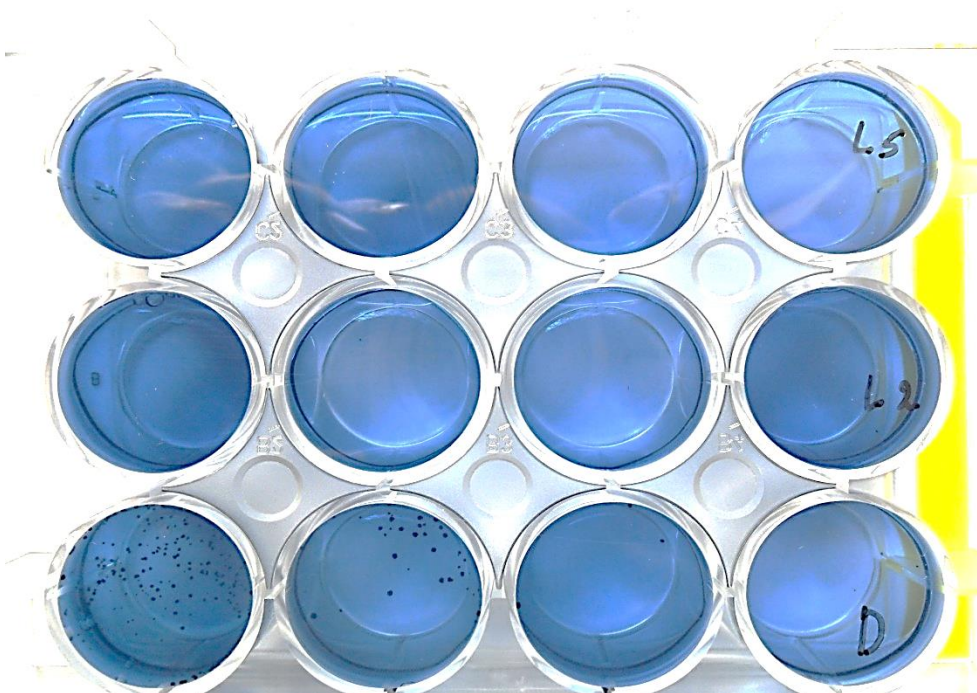
Фиг. 41. Изолиране на *S. mutans* на селективна хранителна среда - типични окръглени колонии с метален вид



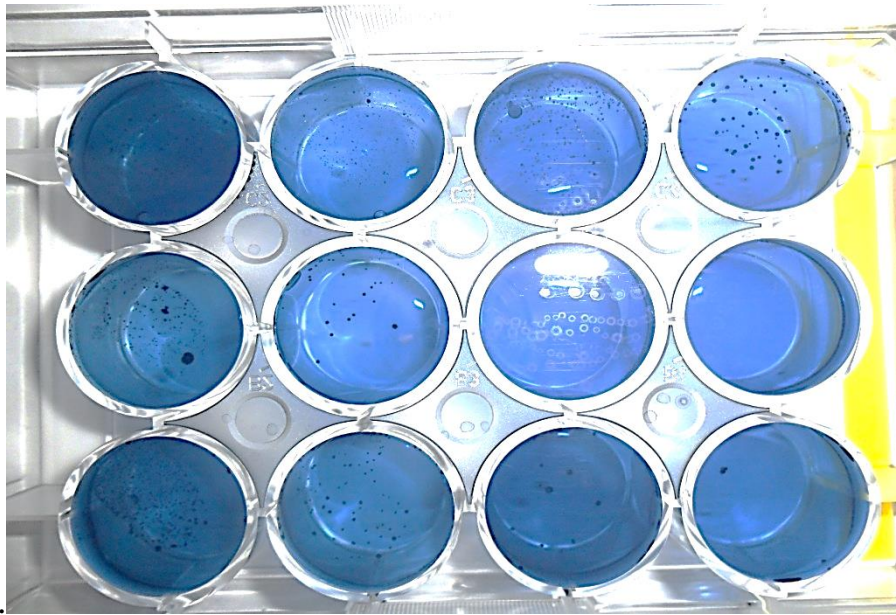
Фиг. 42. Изолиране на *S. species* на MSA<sup>®</sup>



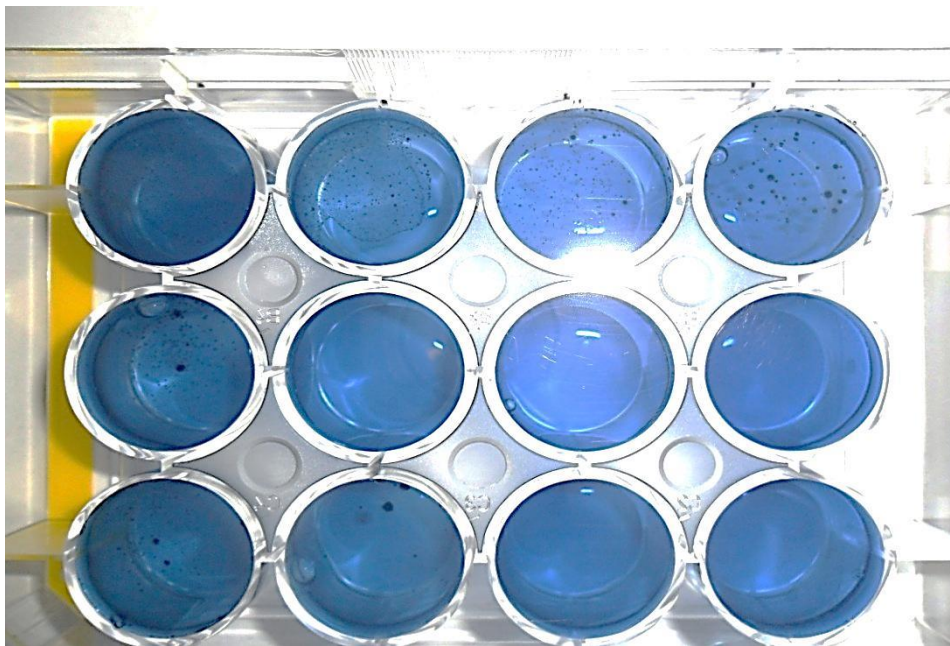
Фиг. 48. Ефект от действието на Фотосан 90 $\mu$ М върху *S. mutans* клинично-изолиран щам - тъмнинна контрола, 2 и 5 минути облъчване



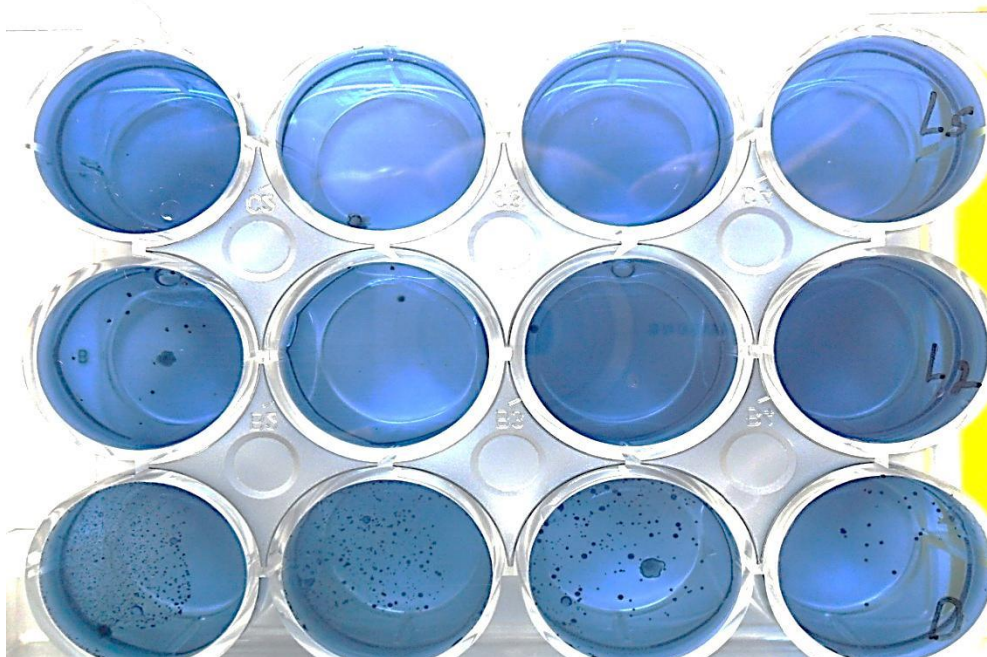
Фиг. 49. Ефект от действието на Фотосан 180 $\mu$ М върху *S. mutans* клинично-изолиран щам - тъмнинна контрола, 2 и 5 минути облъчване



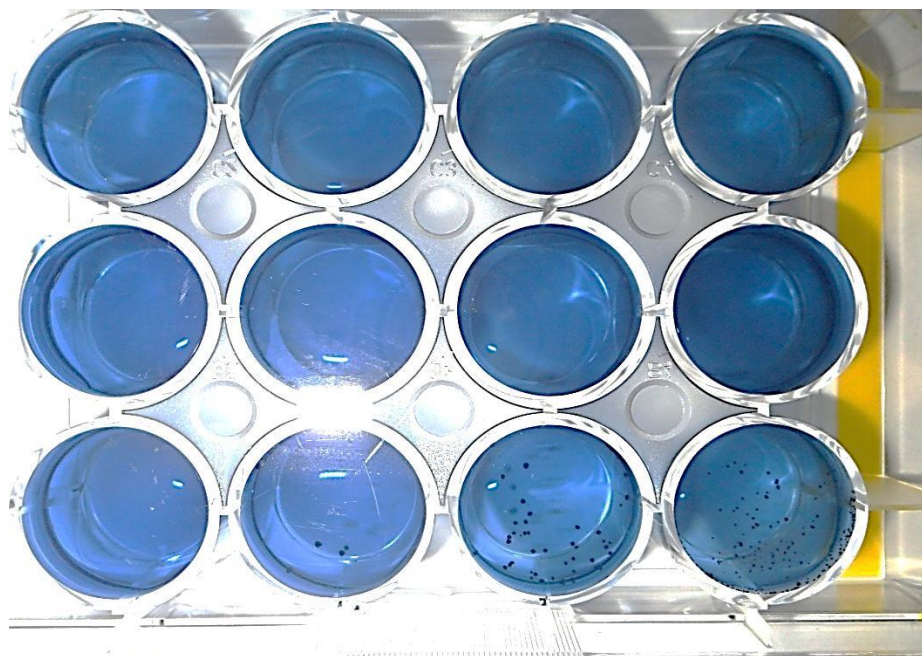
Фиг. 50. Ефект от действието на Фотосан 30 $\mu$ М върху *S. species* клинично-изолирани щамове - тъмнинна контрола, 2 и 5 минути облъчване



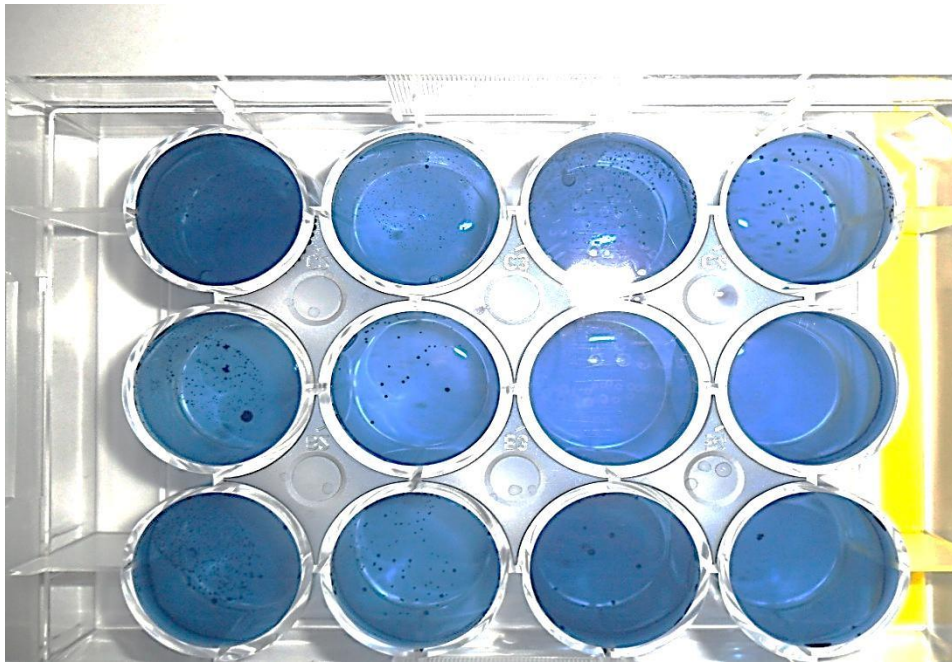
Фиг. 51. Ефект от действието на Фотосан 90 $\mu$ М върху *S. species* клинично-изолирани щамове - тъмнинна контрола, 2 и 5 минути облъчване



Фиг. 52. Ефект от действието на Фотосан 180 $\mu$ М върху *S. species* клинично-изолирани шамове - тъмнинна контрола, 2 и 5 минути облъчване



Фиг. 53. Ефект от действието на Zn-фталоцианин 15 $\mu$ М върху *S. mutans* клинично-изолиран шам - тъмнинна контрола, 2 и 5 минути облъчване



Фиг. 54. Ефект от действието на Zn-фталоцианин 15 $\mu$ M върху *S. species* клинично-изолирани щамове - тъмнинна контрола, 2 и 5 минути облъчване

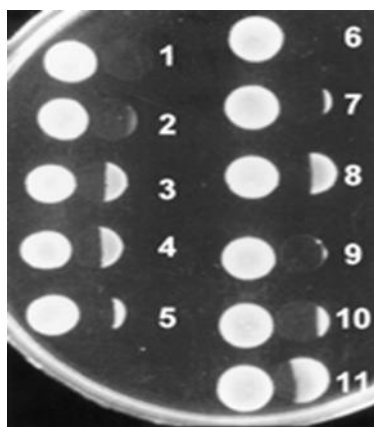
### 3.1. Обсъждане на резултатите от трета задача

Редица микробиологични изследвания доказват, че след формирането на биофилм бактериите пребиваващи в него се различават съществено по своите характеристики и поведение от планктонните бактерии. Това мотивира решението ни да изолираме клиничен щам от 12 микробни дентални плаки-биофилми на произволно избрани индивиди.

В литературата има съобщения за въздействието на АФДТ върху клинично изолирани щамове на *S. mutans* и *S. species*, но при използването на ФС с различен спектър на абсорбция - 440nm. Еритрозин демонстрира възможност за редуциране на CFU/ml с 7 лог, а Роз Бенгал с 3 лог, при използване на светлинен източник - фотополимеризираща лампа. Няма данни за проведени изследвания върху изолирани от човешки биофилм *S. mutans* и *S. species* с ФС® и с Zn-фталоцианин (2, 9, 16, 23-tetrakis 3-methylpyridyloxy).

За целта на този експеримент бе необходимо да подберем подходяща хранителна среда, която да ни позволи изолирането на *S. mutans* ефективно и сигурно и на среда, с която да се осъществи изолирането на *S. species*. Групата от Стрептококи, по данни от литературата, в зрял дентален

биофилм обхваща следните представители: *S. mutans*, *S. Gordoni*, *S. pyogenes*, *S. oralis*, *S. Mitis*, *S. Mittis*, *S. pneumoniae*, *S. cristatus*, *S. parasanguinis*, *S. sanguinis*, *S. Sobrinus*.



Фиг. 55. Потискане на *Streptococci species* от *S. mutans* UA140. 1, *S. gordonii*; 2, *S. pyogenes*; 3, *S. oralis*; 4, *S. mitis* ATCC 33399; 5, *S. mitis* ATCC 903; 6, *S. pneumoniae*; 7, *S. cristatus*; 8, *S. parasanguinis*; 9, *S. sanguinis* ATCC 10556; 10, *S. sanguinis* NY101; 11, *S. Sobrinus*.

От Фиг. 55 става ясно *Streptococcus mutans* е в състояние да потисне развитието на всички останали *Streptococci species* като най-незначителен е този ефект върху *Streptococcus sobrinus* - 11. Ако се смути развитието на *Streptococcus mutans* с АФДТ, както се потвърждава от експеримента, това означава, че ще се развият благоприятно другите видове, а те не са с доказан кариогенен потенциал. Още повече, че проведеното от нас *in vitro* изследване показва два пъти по-слаб фотодинамичен ефект върху *Streptococci species*.

Проведените предварителни пилотни експерименти с 40 $\mu$ M Zn-фталоцианин, осветяването за 2, 5 и 10 минути и получените резултати: липса на тъмнинна токсичност и пълно елиминиране на Стрептококите и при трите времеви интервали, ни насочиха за продължение на основния експеримент в клинично по-приемливите 2 и 5 минути и със значително по-малка концентрация от използваната - 15 $\mu$ M.

Ефектът, който тази концентрация имаше върху жизнеспособността на *Streptococcus mutans* и на *Streptococci species*, а именно: пълна фотоинактивация при 2 и 5 минутно облъчване *Streptococcus mutans*, съчетано със статистически значимо редуциране на CFU/ml *Streptococci species* при



2 мин, и пълно фото-инактивиране при 5 мин показва, че кариогенният бактерий *Streptococcus mutans* изолиран от човешка плака е чувствителен на действието Zn-фталоцианин. Осъществява се и фотодинамично редуциране на CFU/ml *Streptococci species*, но при по-краткото облъчване разликата е от порядъка 2 логаритъма. Леталният ефект върху *Streptococci species* е по-слаб (почти 50%) и е концентрационно-зависим.

**4. Резултати от четвърта задача** - изследване *ин vivo* плакинхибиращото действие на разрешените за клинична употреба у нас фотосенсибилизатори ФотоСан® и Метиленово синьо при възрастни индивиди. Сравнение на плакообразуването отчетено посредством два плак-индекса на контролна група зъби, с група зъби получаваща фотодинамична терапия както за МС, така и за ФС®.

На Табл. 27 и Табл. 28 са представени статистическите анализи от регистрираните плак-индексите на изследваните пациенти, третирани с ФС®, а на Табл. 29 и Табл.30, на пациентите третирани с МС.

Примери от клиничното изследване са илюстрирани на Фиг. 56, Фиг. 57, Фиг. 58, Фиг.59, Фиг. 60, Фиг. 61, Фиг. 62 и Фиг. 63.

Табл. 27. Резултати на третирана с ФС® и контролна група зъбни повърхности, отчетени с плак-индекс РНР-модифициран.

№	възраст	РНР – Фотосан	$x_i - \bar{x}$	$(x_i - \bar{x})^2$	РНР - Контрола	$x_i - \bar{x}$	$(x_i - \bar{x})^2$
1.	45	0,44	-0,11	0,0121	0,8	-0,09	0,0081
2.	40	0,48	-0,07	0,0049	0,84	-0,05	0,0025
3.	40	0,52	-0,03	0,0009	0,8	-0,09	0,0081
4.	38	0,44	-0,11	0,0121	0,84	-0,05	0,0025
5.	40	0,68	0,13	0,0169	0,92	0,03	0,0009
6.	45	0,52	-0,03	0,0009	0,8	-0,09	0,0081
7.	42	0,44	-0,11	0,0121	0,96	0,07	0,0049
8.	39	0,48	-0,07	0,0049	0,8	-0,09	0,0081

9.	35	0,48	-0,07	0,0049	0,96	0,07	0,0049
10.	29	0,52	-0,03	0,0009	0,92	0,03	0,0009
11.	39	0,68	0,13	0,0169	0,96	0,07	0,0049
12.	36	0,44	-0,11	0,0121	0,96	0,07	0,0049
13.	34	0,72	0,17	0,0289	0,96	0,07	0,0049
14.	43	0,72	0,17	0,0289	0,96	0,07	0,0049
15.	42	0,72	0,17	0,0289	0,8	-0,09	0,0081
16.	41	0,68	0,13	0,0169	0,92	0,03	0,0009
17.	42	0,76	0,21	0,0441	0,92	0,03	0,0009
18.	43	0,44	-0,11	0,0121	0,92	0,03	0,0009
19.	41	0,44	-0,11	0,0121	0,92	0,03	0,0009
20.	43	0,44	-0,11	0,0121	0,92	0,03	0,0009
21.	27	0,52	-0,03	0,0009	0,92	0,03	0,0009
22.	28	0,68	0,13	0,0169	0,92	0,03	0,0009
23.	29	0,68	0,13	0,0169	0,88	-0,01	0,0001
24.	32	0,52	-0,03	0,0009	0,88	-0,01	0,0001
25.	32	0,44	-0,11	0,0121	0,88	-0,01	0,0001
26.	40	0,44	-0,11	0,0121	0,84	-0,05	0,0025
27.	40	0,44	-0,11	0,0121	0,88	-0,01	0,0001
28.	41	0,72	0,17	0,0289	0,8	-0,09	0,0081
29.	37	0,44	-0,11	0,0121	0,8	-0,09	0,0081
30.	37	0,52	-0,03	0,0009	0,8	-0,09	0,0081
31.	35	0,68	0,13	0,0169	0,96	0,07	0,0049
32.	32	0,52	-0,03	0,0009	0,96	0,07	0,0049
33.	36	0,68	0,13	0,0169	0,96	0,07	0,0049
34.	38	0,48	-0,07	0,0049	0,96	0,07	0,0049
35.		0,48	-0,07	0,0049	0,96	0,07	0,0049

	Обща сума:	19,28		0,4419	31,28		0,1347
--	---------------	-------	--	--------	-------	--	--------

При  $p=0,05$  и  $K=68$ , теоретичната стойност на  $t$  е **1,96**, а емпиричната е **16,19**; (**16,19** > **1,96**), което ни дава основание да твърдим, че различията са статистически значими.

Табл. 28. Резултати на третирана с ФС<sup>®</sup> и контролна група зъбни повърхности, отчетени с плак-индекс SL.

№	възраст	SL-фс	$x_i - \bar{x}$	$(x_i - \bar{x})^2$	SL-фс	$x_i - \bar{x}$	$(x_i - \bar{x})^2$
1.	45	1,45	0	0	2,56	-0,24	0,0576
2.	40	1,35	-0,1	0,01	2,56	-0,24	0,0576
3.	40	1,55	0,1	0,01	3	0,2	0,04
4.	38	1,25	-0,2	0,04	2,56	-0,24	0,0576
5.	40	1,75	0,3	0,09	2,85	0,05	0,0025
6.	45	1,35	-0,1	0,01	2,7	-0,1	0,01
7.	42	1,25	-0,2	0,04	2,7	-0,1	0,01
8.	39	1,35	-0,1	0,01	2,85	0,05	0,0025
9.	35	1,25	-0,2	0,04	2,85	0,05	0,0025
10.	29	1,35	-0,1	0,01	2,85	0,05	0,0025
11.	39	1,75	0,3	0,09	2,85	0,05	0,0025
12.	36	1,35	-0,1	0,01	2,85	0,05	0,0025
13.	34	1,75	0,3	0,09	2,85	0,05	0,0025
14.	43	1,5	0,05	0,0025	2,85	0,05	0,0025
15.	42	2	0,55	0,3025	2,7	-0,1	0,01
16.	41	1,75	0,3	0,09	2,85	0,05	0,0025
17.	42	1,5	0,05	0,0025	2,85	0,05	0,0025
18.	43	1,5	0,05	0,0025	2,7	-0,1	0,01
19.	41	1,25	-0,2	0,04	2,7	-0,1	0,01

20.	43	1,35	-0,1	0,01	2,85	0,05	0,0025
21.	27	1,35	-0,1	0,01	2,7	-0,1	0,01
22.	28	1,5	0,05	0,0025	2,7	-0,1	0,01
23.	29	1,5	0,05	0,0025	2,85	0,05	0,0025
24.	32	1,25	-0,2	0,04	2,7	-0,1	0,01
25.	32	1,5	0,05	0,0025	2,85	0,05	0,0025
26.	40	1,35	-0,1	0,01	2,85	0,05	0,0025
27.	40	1,35	-0,1	0,01	2,85	0,05	0,0025
28.	41	1,75	0,3	0,09	2,75	-0,05	0,0025
29.	37	1,25	-0,2	0,04	2,75	-0,05	0,0025
30.	37	1,5	0,05	0,0025	2,8	0	0
31.	35	1,5	0,05	0,0025	3	0,2	0,04
32.	32	1,5	0,05	0,0025	3	0,2	0,04
33.	36	1,5	0,05	0,0025	3	0,2	0,04
34.	38	1,25	-0,2	0,04	2,75	-0,05	0,0025
35.		1,25	-0,2	0,04	2,75	-0,05	0,0025
	Обща сума:	50,9		1,1975	97,83		0,4603

При  $p=0,05$  и  $K=68$ , теоретичната стойност на  $t$  е **1,96**, а емпиричната е **37,11**; (**37,11 > 1,96**), което ни дава основание да твърдим, че различията са статистически значими

Табл. 29. Резултати на третираната с МС 145 $\mu$ М и контролна група зъбни повърхности, отчетени с плак-индекс РНР-модифициран.

№	възраст	РНР – Метиленово синьо	$x_i - \bar{x}$	$(x_i - \bar{x})^2$	РНР - Контрола	$x_i - \bar{x}$	$(x_i - \bar{x})^2$
1.	45	0,72	0,02	0,0004	0,8	-0,08	0,0064
2.	40	0,72	0,02	0,0004	0,8	-0,08	0,0064
3.	40	0,76	0,06	0,0036	0,8	-0,08	0,0064

4.	38	0,8	0,1	0,01	0,96	0,08	0,0064
5.	40	0,74	0,04	0,0016	0,92	0,04	0,0016
6.	45	0,76	0,06	0,0036	0,92	0,04	0,0016
7.	42	0,8	0,1	0,01	0,92	0,04	0,0016
8.	39	0,52	-0,18	0,0324	0,84	-0,04	0,0016
9.	35	0,68	-0,02	0,0004	0,8	-0,08	0,0064
10.	29	0,52	-0,18	0,0324	0,88	0	0
11.	39	0,52	-0,18	0,0324	0,88	0	0
12.	36	0,52	-0,18	0,0324	0,88	0	0
13.	34	0,68	-0,02	0,0004	0,8	-0,08	0,0064
14.	43	0,8	0,1	0,01	0,8	-0,08	0,0064
15.	42	0,8	0,1	0,01	0,8	-0,08	0,0064
16.	41	0,76	0,06	0,0036	0,88	0	0
17.	42	0,72	0,02	0,0004	0,88	0	0
18.	43	0,68	-0,02	0,0004	0,88	0	0
19.	41	0,72	0,02	0,0004	1	0,12	0,0144
20.	43	0,72	0,02	0,0004	1	0,12	0,0144
21.	27	0,68	-0,02	0,0004	0,8	-0,08	0,0064
22.	28	0,72	0,02	0,0004	0,88	0	0
23.	29	0,68	-0,02	0,0004	0,88	0	0
24.	32	0,8	0,1	0,01	1	0,12	0,0144
25.	32	0,8	0,1	0,01	1	0,12	0,0144
26.	40	0,84	0,14	0,0196	0,84	-0,04	0,0016
27.	40	0,8	0,1	0,01	0,84	-0,04	0,0016
28.	41	0,68	-0,02	0,0004	0,96	0,08	0,0064
29.	37	0,52	-0,18	0,0324	0,96	0,08	0,0064
30.	37	0,48	-0,22	0,0484	0,6	-0,28	0,0784

31.	35	0,72	0,02	0,0004	0,96	0,08	0,0064
32.	32	0,76	0,06	0,0036	0,96	0,08	0,0064
33.	36	0,68	-0,02	0,0004	0,84	-0,04	0,0016
34.	38	0,72	0,02	0,0004	0,84	-0,04	0,0016
35.		0,68	-0,02	0,0004	0,84	-0,04	0,0016
	Обща сума:	24,5		0,3224	30,64		0,2336

При  $p=0,05$  и  $K=68$ , теоретичната стойност на  $t$  е **1,96**, а емпиричната е **8,45**; (**8,45 > 1,96**), което ни дава основание да твърдим, че различията са статистически значими.

Табл. 30. Резултати на третираната с  $MC\ 145\mu M$  и контролна група зъбни повърхности, отчетени с плак- индекс SL

№	възраст	SL – Метиленово синьо	$x_i - \bar{x}$	$(x_i - \bar{x})^2$	SL - Контрола	$x_i - \bar{x}$	$(x_i - \bar{x})^2$
1.	45	2	0,37	0,1369	2,85	0,07	0,0049
2.	40	2	0,37	0,1369	3	0,22	0,0484
3.	40	1,5	-0,13	0,0169	2,85	0,07	0,0049
4.	38	1,75	0,12	0,0144	2,8	0,02	0,0004
5.	40	1,75	0,12	0,0144	2,85	0,07	0,0049
6.	45	1,75	0,12	0,0144	2,82	0,04	0,0016
7.	42	1,75	0,12	0,0144	2,85	0,07	0,0049
8.	39	1,5	-0,13	0,0169	2,85	0,07	0,0049
9.	35	1,75	0,12	0,0144	3	0,22	0,0484
10.	29	1,5	-0,13	0,0169	3	0,22	0,0484
11.	39	1,25	-0,38	0,1444	2,85	0,07	0,0049
12.	36	1,25	-0,38	0,1444	3	0,22	0,0484
13.	34	1,75	0,12	0,0144	3	0,22	0,0484
14.	43	1,5	-0,13	0,0169	2,7	-0,08	0,0064

15.	42	1,75	0,12	0,0144	3	0,22	0,0484
16.	41	1,75	0,12	0,0144	2,8	0,02	0,0004
17.	42	1,5	-0,13	0,0169	2,85	0,07	0,0049
18.	43	1,75	0,12	0,0144	2,82	0,04	0,0016
19.	41	2	0,37	0,1369	2,7	-0,08	0,0064
20.	43	1,75	0,12	0,0144	3	0,22	0,0484
21.	27	1,5	-0,13	0,0169	2,85	0,07	0,0049
22.	28	1,75	0,12	0,0144	2,8	0,02	0,0004
23.	29	1,5	-0,13	0,0169	2,8	0,02	0,0004
24.	32	1,75	0,12	0,0144	3	0,22	0,0484
25.	32	1,75	0,12	0,0144	3	0,22	0,0484
26.	40	1,5	-0,13	0,0169	2,85	0,07	0,0049
27.	40	1,5	-0,13	0,0169	2,8	0,02	0,0004
28.	41	1,25	-0,38	0,1444	3	0,22	0,0484
29.	37	1,25	-0,38	0,1444	1,5	-1,28	1,6384
30.	37	1,25	-0,38	0,1444	1,25	-1,53	2,3409
31.	35	1,75	0,12	0,0144	2,8	0,02	0,0004
32.	37	1,75	0,12	0,0144	2,8	0,02	0,0004
33.	36	1,5	-0,13	0,0169	2,7	-0,08	0,0064
34.	38	1,75	0,12	0,0144	2,7	-0,08	0,0064
35.		1,75	0,12	0,0144	2,85	0,07	0,0049
	Обща сума:	57		1,5465	97,29		4,5439

При  $p=0,05$  и  $K=68$ , теоретичната стойност на  $t$  е  $1,96$ , а емпиричната е  $16,42$ ; ( $16,42 > 1,96$ ), което ни дава основание да твърдим, че различията са статистически значими.

**Забележка:** При статистическия анализ представен на Табл. 37, Табл. 38, Табл. 39 и Табл. 40, важат следните статистически величини и зависимости:

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}, \text{ където:}$$

$x_i$  – осредняваните значения на признака;

$n$  – броят на случаите в извадката.

$\bar{x}_1, \bar{x}_2$  – сравняваните средни величини от двете извадки;

$\sigma_1, \sigma_2$  – средните квадратични отклонения от двете извадки;

$n_1, n_2$  – броят на случаите в двете извадки.

Табл. 31. Обобщени стойности на резултатите от АФДТ върху структурирането *in vivo* на дентален биофилм

	<b>РНР<sub>мод</sub> - АФДТ</b>	<b>РНР<sub>мод</sub> - контрола</b>	<b>SL - АФДТ</b>	<b>SL - контрола</b>
<b>МС-Стойност</b>	0,7	0,89	1,62	1,77
<b>МС-Оценка мод</b>	умерено-изобилно	изобилно	умерено	изобилно
<b>ФС<sup>®</sup>-Стойност</b>	0,5	0,88	1,45	2,79
<b>ФС<sup>®</sup>- Оценка</b>	умерено	изобилно	умерено	изобилно

Данните в Табл. 31 са представени като средно-аритметична стойност.





Фиг. 56. Оцветяване с фуксин, контролна група на 72-ия час от изследването - ФС®



Фиг. 57. Оцветяване с фуксин, контролна група зъби в ляво и третирана в дясно на 72-ия час от изследването - ФС®



*Фиг. 58.* Оцветяване с фуксин, третирана група зъби на 72-ия час от изследването - ФС®



*Фиг. 59.* След провеждане на КОХ



*Фиг.60.* Оцветяване с фуксин, третирана група зъби в дясно на 72-ия час от изследването - МС



*Фиг. 61.* Оцветяване с фуксин, третирана група зъби на 72-ия час от изследването - МС



Фиг. 62. Оцветяване с фуксин, контролна група зъби на 72-ия час от изследването - МС



Фиг. 63. След провеждане на КОХ

#### 4.1. Обсъждане на резултатите от четвърта задача

Клиничният експеримент се провежда в рамките на 72 часа (три денонощия) от спиране на орално-хигиенните грижи, тъй като целта ни е да проследим има ли ефект АФДТ с избрани от нас ФС на базата на предшестващи *in vitro* изследвания, върху формирането на този ранен биофилм, съставен предимно от *MS* и *Streptococci Species*.

Статистическата обработка показва сигнификантна разлика в резултатите получени при групите зъби получаващи АФДТ и контролните

групи зъби, както за групата третирана с МС, така и тази третирана с ФС<sup>®</sup> (активно вещество ТС). Статистически значима разлика се отчита и при определяне количеството образуван биофилм, както с ПИ - SL, така и с модифицирания от нас за целите на експеримента индекс - РНР.

Положителният резултат (по-малко количество образуван биофилм) е по-изразен при групата получаваща АФДТ с ФС<sup>®</sup>. По-слабият ефект, наблюдаван при използването на МС, вероятно се дължи на отличаваща характеристика между двата фотосенсибилизатора по отношение на коефициента им за разделяне  $P$ , който е почти трикратно по-висок за ТС. Това съотношение отразява по-високата възможност на молекулите на ТС да преминават и да се натрупват хидрофобните области на клетъчната мембрана и следователно да изявят по-силен фотобактерициден ефект. Като допълнение, молекулите на ТС имат по-висока способност да димеризират от тези на МС.

За разлика от ТС, което повишава пропускливостта на клетъчната мембрана, то МС се свързва с бактериалната ДНК, генерира нишковидни скъсвания в структурата и това води до генетични мутации и като краен резултат се осъществява фоторазрушение на бактериалната клетка. Мястото на вътребактериално натрупване и съответно, специфично бактерицидно действие, е пряко свързано с инкубационното време преди осветяване. Времето необходимо на фотосенсибилизаторите оказващи влияние на ДНК е по-дълго от това на тези, които увреждат клетъчната мембрана.

В изследването използваме едно и също време за тъмнино инкубиране (1 мин) и вероятно тази продължителност е недостатъчна за МС да се натрупва в бактериалните клетки и да стане причина за съществен фотодинамичен ефект.

Резултатите са обещаващи, и статистически достоверна е разлика между групата третирана с МС и контролната група зъби. Факт е, обаче че при зъбите получаващи ФС<sup>®</sup> оценката на количеството формиран биофилм според РНР мод. е *умерено*, а при групата получаваща МС е *изобилно*, макар и да попада в диапазона на тази оценка само заради една стотна.

*Wood et al*, провеждат *in vitro* фотодинамичен експеримент, но върху *in vivo* структуриран 7-дневен биофилм при естествени условия. Биофилмът се натрупва върху специална пластинка, прикрепена към

емайла на зъб в устата на пациент. След тъмнинна инкубация с Zn-фталоцианин и проведена АФДТ с LED светлинен източник, на трансмисионен електронен микроскоп са наблюдавани следните ефекти: изтъняване и загуба на маса на биофилма; редуциране на размера на микро-пространствата вътре в биофилма; значително увреждане на бактериите, изразяващо се във вакуализация на цитоплазмата и мембранно увреждане.

Първото и единствено публикувано, доколкото ни е известно, изследване на ефекта на АФДТ върху структурирането на биофилм *in vivo* е от края на 2014 г. Авторите, *Ichinose-Tsuno A et al.*, използват ТС в концентрация 150μM, тъмнинното инкубиране 10 sec и изследват ефекта на фотодинамична дезинфекция върху 11 доброволци-дентални лекари, които прекратяват орално-хигиенни грижи за 4 денонощия. Използваната светлина е LED генерирана. Натрупаното количество биофилм се изчислява със софтуер, който обработва заснети изображения на позитивиран с фуксин, биофилм. Обект на експресното микробиологично изследване е *S. oralis* и посредством бърз тест за определяне на бактериални клетки докладват статистическа редукция на CFU/мл в биофилма след АФДТ.

Методиката на нашето клинично изследване се различава в параметрите на светлинно въздействие: брой процедури и продължителност. Ние прилагаме 3 пъти АФДТ с общо време на облъчване на сеанс - 8 минути. Те провеждат 8кратно третиране с АФДТ, но за много по-къс интервал от време - 80 sec на сеанс.

В осъщественото от нас изследване, оценката на количеството структуриран биофилм се извършва съобразно регистрираните стойности на два плак-индекса. Данните от японския експеримент бяха публикувани, след като нашият клиничен експеримент беше приключил и макар, че целта на двата експеримента е много близка, в нашия проследяваме ефекта и на друг фотосенсибилизатор (МС), и отчитаме резултатите по оригинален начин.

Считаме, че резултатите от двата експеримента потвърждават възможността за контрол върху ранните етапи на структуриране на биофилма посредством АФДТ, проведена с LED и ТС.

При проведеното за първи път от нас изследване по описаната оригинална методика, доказахме загуба на маса на биофилма чрез количественото му измерване с плак-индекси. Базираме се на данни публикувани през 1987 година от *Schaeken et al.*, който доказва връзката между количеството *Streptococcus mutans* в денталния биофилм отчетена с CFU/ml и оценката получена по плак индекса на Силнес и Льо. Увеличаването на количеството CFU/ml *Streptococcus mutans* с 1 лог в плаката, се отразява с една единица промяна в стойността, отчетена с плак индекса на Силнес и Льо.

Считаме, че проведеното сравнително изследване обективизира данните получени и при използването на друг индекс, оценяващ плаконатрупване при АФДТ и модифициран от нас за целите на клиничното ни изследване - РНР. Статистическа обработка показва, че независимо с кой от двата индекса е работено при оценката на плакообразуването, няма разлика в оценката.

## ПРЕПОРЪКИ

Препоръчваме метода на АФДТ като основен или допълващ подход в следните ситуации, затрудняващи традиционните механични или химични методи за контрол на биофилма:

- ❖ При индивиди с временна или постоянно затруднена мануалност:
  - Инвалидизирани хора с увреждания в областта на раменните стави, травми имобилизации след фрактури.
  - Пациенти, пребиваващи в интензивни отделения.
  - Междучелюстни фиксации при фрактури.
  - Лица с ментални увреждания - по-лесно приложим в сравнение с провеждането на механична орална хигиена от обслужващия персонал.
- ❖ Индивиди с висок риск от зъбен кариес, отказващи да използват традиционни пасты за зъби съдържащи флуориди.
- ❖ Индивиди с висок риск от зъбен кариес, при които се изявяват странични ефекти от химична инхибиция на биофилма.
- ❖ Като профилактично средство допълващо традиционните подходи - механичен и химичен за контрол на биофилма.
- ❖ Като част от всекидневния бактериален и *pH* контрол по време на лечението на БДЛ.
- ❖ При наличие на различна по степен свръхчувствителност от страна на ТЗТ и отказ или невъзможност на пациентите да провеждат механична орална хигиена.
- ❖ Изтънен, деминерализиран или липсващ емайл, уязвим на механичен натиск поради силно намаленото минерално съдържание и налична потребност от оптималното му съхраняване за реминерализация.



## ИЗВОДИ

### Изводи от първа задача:

1. Прилагането на първичната и вторична профилактика в областта на денталното здраве и по-конкретно в областта на зъбния кариес е на ниско ниво. Налице е липса на целенасочен профилактичен подход сред по-големия процент на практикуващите зъболекари на територията на гр. Варна.
2. Диетата и оралната хигиена се посочват като единствени подходи за контрол на киселинността на денталния биофилм. КОХ се комбинира с екзогенна флуорна профилактика от много малък процент дентални лекари.
3. Съществува потребност от популяризиране на методиката и създаване на финансово достъпна алтернатива, като повече от половината анкетирани дентални лекари са готови да въведат този нов метод за кариесната профилактика на възрастния пациент.
4. По-голямата част от анкетирани дентални лекари (88%), изпитват затруднения при диагностицирането и лечението на БДЛ.

### Изводи от втора задача:

1. Петте използвани фотосенсибилизатори имат ефект на фотоинактивиране на *Streptococcus mutans* - лабораторен щам.
2. Най-съществена фотоинаktivация се наблюдава при използването на Zn-фталоцианин и Фотосан 2 - пълна фотоинаktivация.
3. Метиленовото синьо и Фотосан 1 показаха значителна редукция на CFU/ml, което съчетано с липсата на тъмнинна токсичност, ги нарежда сред удачните вещества за фотодинамична дезинфекция.
4. Единственото вещество, при което наблюдавахме пълно инаktivиране на бактериите без прилагането на светлина е Ga-металфталоцианин при концентрация от 5-6µM.
5. Si-металфталоцианин демонстрира фотодинамичен ефект изразяващ се в редуциране с 1 логна CFU/ml - 10% редукция. Това е фотосенсибилизаторът с най-слаб ефект.

### **Изводи от трета задача:**

1. Базисната кариогенна група бактерии - *Streptococcus mutans* показва пълно повлияване в резултат на АФДТ. Фотодинамичният ефект върху *Streptococci species* е два пъти по-слаб.
2. При третиране с концентрации 30µМ и 90µМ на клинично утвърдения ФС<sup>®</sup> за АФДТ се получи пълна фотоинактивация (100%) на *Streptococcus mutans*.
3. Статистическо достоверно е редуцирането на броя CFU/ml и при двата интервала на облъчване.
4. Времевият интервал не оказва никакво влияние при използваната концентрация от 15µМ за Zn-фталоцианин.
5. И двата изследвани ФС са подходящи за провеждане на АФДТ целяща редуциране на кариогенния микробен фактор в биофилма. Препоръчителна е по-ниска концентрация и време за облъчване от 2 до 5 минути.
6. Zn-фталоцианин след провеждане на някои допълнителни изследвания и сертифициране в ИАЛ и разрешение за клинична употреба, може успешно да се използва за профилактика на кариеса при възрастни индивиди.

### **Изводи от четвърта задача:**

1. В резултат на проведената АФДТ се възпрепятства структурирането на денталния биофилм в ранните етапи от спиране на орално-хигиенните грижи.
2. Статистически значим резултат се наблюдава и при двете използвани от нас багрила за целите на клиничното изследване. По-съществен е ефектът при прилагането на ФС<sup>®</sup>, сравнено с ефекта при МС.
3. Редуцирането на *MS* в резултат на проведената АФДТ води до качествени изменения в биофилма. Налице е пряка зависимост между логаритмичното увеличение на броя *S. mutans* в биофилма и стойностите на SL и РНР.

4. АФДТ с ФС<sup>®</sup> и МС е подходящ допълващ метод за контрол на кариогенния биофилм и контрол на началните деминерализационни некавитирани лезии на емайла.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящата разработка, проучихме възможностите на иновативен подход за контрол на кариогенния биофилм, базиран на все по-налагащата се АФДТ, като алтернатива на конвенционалните антибиотици и антисептици, особено в области, където има необходимост и възможност за локално повлияване. В сферата на тези области попада и устната кухина и обособените в нея анатомично-физиологично единици - ендодонциум, пародонтално пространство и периапикален периодонциум, твърди зъбни тъкани, лигавица.

В рамките на нашия научен труд ние изследвахме възможностите на три металфталоцианинови багрила - Zn-, Si-, Ga-металфталоцианин, две тиазидни багрила разрешени за клинична употреба - метиленово синьо и толуидиново синьо. Единственият патентован търговски продукт и налагащ се в денталната практика е Фотосан<sup>®</sup> (активно вещество толуидиново синьо). Потвърдихме неговата ефективност при фотоинактивиране на референтен лабораторен щам на *S. mutans* и установихме ефективността му върху клинично изолиран щам, както и при *in vivo* прилагане за ограничаване масата на биофилма, в ранните стадии от структурирането му. Успяхме да сравним ефикасността на АФДТ при различни времеви интервали на светлинно активиране и различни концентрации на активното вещество.

Потвърдихме ефективността на синтезирания в нашата страна Zn-фталоцианин върху лабораторен референтен щам на *S. mutans* и дефинирахме концентрационните и времеви параметри на ефективността му върху клиничен изолат на *S. mutans* и *S. species*. Установихме наличието на съществена тъмнинна токсичност при един от синтезираните в нашата страна Ga-фталоцианин 5-6 $\mu$ M, с което го отхвърлихме като потенциален ФС за кариесна профилактика.

Установихме ефективността на МС върху лабораторен референтен щам на *S. mutans*, като в експеримента променихме съществено описаната в литературата продължителност на времето за тъмнинно инкубиране.

При всички изследвания светлинният източник за АФДТ беше LED. Прицелни микроорганизми бяха: *S. mutans* - референтен лабораторен щам, *S. mutans* и *Streptococci species* - изолирани от дентален биофилм.

Проучихме ефекта на АФДТ с тиаздни багрила (ФС<sup>®</sup> и МС) върху *in vivo* структуриран дентален биофилм, ранна фаза - до 72-ия час. За целите на клиничното изследване модифицирахме плак-индекс и обективизирахме неговите възможности.

Получените от проведените *in vivo* и *in vitro* изследвания резултати, позволяват да се изкаже хипотезата, че ако в този най-ранен етап на структурирането на биофилма се изключат *MS*, но не се повлияе на *Streptococci species* (резултати от третата ни задача), то е възможно, в последствие, инкорпорирането на *MS* в структурата на създадения биофилм да е силно затруднено.

Наред с тези лабораторни и клинични изследвания, проведохме и социологическо проучване чрез анкетна карта. Резултатите от анкетата показаха липса на систематичен антикариесен подход, непознаване на АФДТ, но желание за въвеждане на иновативен метод за контрол на биофилма. Паралелно с това, установихме необходимост от намаляване на клиничното време за профилактика и предлагане на иновативен метод за допълване на традиционната кариесна профилактика на възрастния пациент.

# САМООЦЕНКА НА ПРИНОСИТЕ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

## Приноси с научно-практически характер

1. Модифициране на РНР-индекс към относително малка част от зъбната повърхност с цел статистическо обективизиране на резултатите.

## Приноси с потвърдителен характер

1. Потвърждаваме ефективността на ФС<sup>®</sup> при концентрация от 34-50μМ - потискане развитието на *Streptococcus mutans* с 4 лог CFU/ml
2. Потвърждаваме ефективността на Zn-фталоцианин 5,6μМ потискане развитието на *Streptococcus mutans* с 6 лог CFU/ml.
3. Потвърждаваме високата тъмнинна токсичност на Ga-фталоцианин при концентрация 5,6μМ.
4. Потвърждаваме загубата на биомаса при третиране на биофилм с АФДТ.

## Приноси с оригинален характер

1. Доказваме за първи път ефективност на МС при концентрация 145μМ - потискане с 3,5 лог. CFU/ml, като повишаваме времето за тъмнинно инкубиране.
2. Докладваме за първи път ефективността *in vitro* на ФС<sup>®</sup> и Zn-фталоцианин върху клинично изолирани *S. mutans* и *S. species*.
3. За първи път се оценява ефекта от АФДТ с ФС<sup>®</sup> и МС посредством плак индекси *in vivo*.
4. За първи път използваме индекс РНР и го модифицираме.
5. Обективизиране и сравняване възможностите на РНР модифициран за количествена оценка на биофилма с утвърдения плак-индекс SL.
6. Докладваме загубата на биомаса при третиране на биофилм с АФДТ с ФС<sup>®</sup> и МС.

## ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ

### Публикации, свързани с темата на дисертационния труд:

1. **Doychinova M.**, V. Kussovski, T. Stoeva, T. Tonchev, V. Doganjisska, S. Dimitrov, I. Katreva-Bozukova, V. Mantareva, I. Angelov. In vitro study of the photodynamic inactivation of cariogenic bacterium *Streptococcus mutans* - reference strain. *SSM*, 45, 2013, 5, 27-32.
2. Dogandzhiyska V., R. Gergova, S. Dimitrov, **M. Doychinova**. Antimicrobial activity of photodynamic therapy against microorganisms isolated from deep carious lesions. *Journal of IMAB - Annual Proceeding (Scientific Papers)* 19, 2013, No 4, 430-434.
3. **Doychinova M.**, S. Dimitrov, V. Kussovski, T. Tonchev. Photodynamic inactivation of human dental biofilm isolated *Streptococcus Mutans* with 2 photosensitizers - an in vitro study. *SSM*, 47, 2015, 1,13-19.

### Научни съобщения:

1. **Doychinova M.**, S.Dimitrov. Inhibiting effect of FotoSan low and methylene blue as photosensitizers on dental biofilm formation - in vivo study. 19<sup>th</sup> congress of Balkan Stomatological Society, Book of abstracts. PP 417.
2. Mantareva V., **M. Doychinova**, V. Kussovski, Sl. Dimitrov, I. Angelov. In vitro study of photodynamic inactivation of cariogenic bacterium *Streptococcus mutans*. Seventh international school of quantum electronics: "Laser physics and applications", Nessebar, 2012

### Лекции на международни и регионални форуми:

1. **Doychinova M.** Photodynamic therapy in dental practice. - 19<sup>th</sup> congress of Balkan Stomatological Society, Belgade, 2014, Book of abstracts. L 134.
2. **Дойчинова М.** Антибактериалната фотодинамична терапия. Светлината в надпревара с антибиотиците. 2ри Регионален форум Варна Дент, 2015, Мениджмънт на денталния биофилм - симпозиум в рамките на Булмедика Булдентал, София 2015.

