

## TERAPIA FOTODINAMICĂ ANTIMICROBIANĂ O STRATEGIE PENTRU PREVENIREA CARIILOR DENTARE LA COPII

Aurelia SPINEI, Iurie SPINEI, Gheorghe ȚÎBÎRNĂ.

Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova

### Rezumat.

Scopul studiului a fost evaluarea efectului terapiei fotodinamice antimicrobiene (TFDA) asupra proprietăților *biofilmului dentar* la copiii cu risc carios mare.

În studiu au fost incluși 120 de copii cu risc carios mare cauzat de activitatea cariogenică sporită a biofilmului dentar. Predicția cariei dentare și evaluarea complexă a riscului carios a fost efectuată cu aplicarea *Software Cariogram*. A fost studiată sensibilitatea tulpinilor microbiene din biofilmul dentar la acțiunea TFDA prin determinarea numărului total de germeni în 1 g de biofilm dentar (NTG/g) și identificarea bacteriilor din probele de biofilm dentar cu utilizarea cartelei *GPI* a sistemului automat *Vitek 2*. Datele obținute au demonstrat că efectuarea TFDA urmată de administrarea probioticelelor au influențat proprietățile cariogenice a biofilmului dentar la copii prin: modificarea peisajului microbial al biofilmului dentar caracterizată de scăderea numărului *Streptococcus mutans* și *Streptococcus sobrinus* simultan cu creșterea numărului *Streptococcus salivarius* și *Streptococcus sanguinis*, reducerea cazurilor de asocieri agresive a bacteriilor și a producerii de acizi. Acest fapt a majorat șansele de evitare a apariției cavitațiilor carioase noi de 1,79 ori la copiii inițial cu risc carios mare și extrem. Concluzii: aplicarea TFDA oferă noi oportunități în elaborarea metodelor eficiente de prevenire a cariilor dentare la copiii cu risc carios mare cauzat de activitatea cariogenică sporită a biofilmului dentar.

**Cuvinte-cheie:** risc carios, biofilm dentar, terapia fotodinamică antimicrobiană, probiotice.

### Summary. Antimicrobial photodynamic therapy as a strategy to prevent dental caries in children

Aim was to evaluate the effect of antimicrobial photodynamic therapy on dental biofilm properties at high caries risk children. The study included 120 children with high caries risk caused by increased activity of cariogenic dental biofilm. Prediction of dental caries and the complex assessment of caries risk was carried out through *Cariogram Software*. The sensitivity of microbial strains from dental biofilm was studied through APDT action by determining the total number of bacteria in 1 g of dental biofilm (TNB/g). Identification of bacteria from samples of dental biofilm was realized using *GPI* card of automatically system *Vitek 2*. The obtained data have shown that APDT application followed by administration of probiotics, influences the properties of cariogenic dental biofilm in children: microbial modification of dental biofilm picture characterized by the decrease number of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* simultaneously with the growth of *Streptococcus salivarius* and *Streptococcus sanguinis*, reduction of aggressive combination of bacteria and acid producing. This has increased chances of avoiding the emergence of new carious cavities 1.79 times in children with initially high and extreme caries risk. Conclusions: APDT application offers new opportunities in developing effective methods to prevent dental caries in high caries risk children, resulted from increased activity of cariogenic dental biofilm.

**Key-words:** caries risk, dental biofilm, antibacterial photodynamic therapy, probiotics.

### Резюме. Антимикробная фотодинамическая терапия стратегия профилактики кариеса зубов у детей

Целью исследования было оценить влияние антимикробной фотодинамической терапии (АФДТ) на свойства биопленки зубов у детей с высоким риском развития кариеса. Материал и методы. В исследование были включены 120 детей с высоким риском кариеса, вызванным повышенной кариогенной активностью биопленки зуба. Прогнозирование кариеса зубов и комплексная оценка риска кариеса проводились с использованием *Software Cariogram*. Чувствительность микробных штаммов из биопленки зуба к действию АФДТ была изучена путем определения общего количества микроорганизмов в 1 г биопленки зуба (ОКМ/г) и идентификации бактерий в пробах биопленки зуба с использованием карты *GPI* автоматической системы *Vitek 2*. Результаты. Полученные данные показали, что выполнение АФДТ с последующим введением пробиотиков влияло на кариогенные свойства зубной биопленки у детей путем: изменения микробного состава зубной биопленки, характеризуемого уменьшением количества *Streptococcus mutans* и *Streptococcus sobrinus* одновременно с ростом *Streptococcus salivarius* и *Streptococcus sanguinis*, редукции частоты агрессивных ассоциации бактерий и продукции кислот. Этот факт увеличил шансы избежать появления новых кариозных полостей в 1,79 раза у детей, первоначально находящихся в группе высокого и экстремального риска кариеса зубов. Выводы: применение АФДТ открывает новые возможности в разработке эффективных методов профилактики кариеса у детей с высоким риском, вызванным повышенной кариогенной активностью биопленки зуба.

**Ключевые слова:** риск кариеса, зубная биопленка, фотодинамическая антимикробная терапия, пробиотики.

## Introducere

Odată cu progresul științei, caria dentară (CD) nu mai este considerată un proces distructiv ireversibil, iar în anumite situații clar definite acesta poate fi reversibil [2]. Datorită acestui fapt măsurile cariopreventive dobândesc tot mai mult teren. Prin urmare, orientarea, în primul rând spre prevenire și nu spre tratament, necesită eficientizarea metodelor de profilaxie primară și secundară, axate pe evaluarea riscului individual [25]. În acest context, Adrian S., 2015, afirmă că modelul medical de tratament în CD s-a dezvoltat grație elaborării teoriei ecologice a biofilmului dentar precum și identificării factorilor de risc, obiectivul principal al acestuia fiind „tratamentul etiologic, de control și eliminare a tuturor factorilor cu implicare clinică în inducerea unui mediu oral favorabil declanșării bolii carioase” [2].

Aas J. și coaut., 2008, au demonstrat că există o microbiotă distinctivă a cavității orale sănătoase, compoziția biofilmului dentar fiind diferită la persoanele cu CD și la cele libere de carie, odată cu avansarea procesului sau în perioada dentiției temporare și permanente. Aceste constatări susțin ipoteza rolului biofilmului în etiologia cariei dentare, conform căreia schimbarea factorilor ecologici provoacă modificarea compoziției comunității microbiene. Autorii au sugerat necesitatea realizării unor studii care ar identifica condițiile ecologice care influențează constituirea comunităților bacteriene specifice care contribuie la inițierea procesului carios [1].

Conform conceptului actual, biofilmul reprezintă o unitate biologică activă, un ecosistem specializat ce asigură vitalitatea și conservarea tipurilor sale constitutive de microorganisme, precum și creșterea populației lor generale [8, 15, 27]. Conceptul de biofilm reprezintă o nouă paradigmă în microbiologie, 99% dintre bacteriile de pe Terra trăind asociate în Consorții complexe, atașate suprafețelor. Stabilirea fenomenelor de diferențiere celulară și de specializare individuală a bacteriilor și comportamentul lor social au determinat savanții în domeniu să lanseze ipoteza că biofilmele sunt sisteme multicelulare primitive.

Placa bacteriană constituie un biofilm structural și funcțional organizat, atașat de suprafața dură a dintelui și acoperit cu o matrice din polimeri de origine bacteriană. În procesul de formare a leziunilor carioase, în compoziția biofilmului predomină streptococii, în special *Streptococcus mutans*. Un șir de cercetări [17, 19, 20] au confirmat rolul primordial al *Streptococcus mutans* în formarea leziunilor carioase la etapele inițiale. *Streptococcus mutans* sunt microorganismele adaptate perfect la mediul cariogen (concentrație ridicată de hidrocarbonate și o valoare scăzută a pH-ului), numite bacterii exclusiv cariogene. Tulpinile altor bacterii (*Streptococcus mitis*) posedă unele dintre aceste proprietăți care provoacă demineralizarea smalțului. În cazul avansării procesului

carios se majorează numărul de lactobacili și crește importanța lor patogenă [17]. Particularitățile biofilmului dentar sunt diversitatea mare de specii bacteriene regăsite în acesta și comunicarea între ele sau între microcomunități și *quorum sensing*. Scopul acestei comunicări este semnalizarea prezenței reciproce și modularea expresiei genetice ca răspuns la modificările densității populaționale. Patogenitatea biofilmului dentar este consecința rezistenței crescute a bacteriilor din componența sa față de substanțele antimicrobiene, precum și a incapacității celulelor de apărare ale gazdei de a le fagocita [24].

Luând în considerare caracterul multifactorial al CD și faptul că modificările în componența biofilmului dentar, care au loc în timpul inițierii și evoluției acestei afecțiuni, nu sunt identificate suficient, pentru prevenirea ei s-a propus utilizarea remediilor antibacteriene cu un spectru larg de acțiune [7].

Preparatele antibacteriene utilizate în prezent s-au dovedit a fi eficiente în prevenirea formării biofilmului cariogen precum și profilaxia CD, cu condiția că sunt aplicate în conformitate cu indicațiile individuale [7, 24]. Deși numeroasele formule care conțin fluoruri, clorhexidină, triclosan ș.a. sunt aprobate pentru utilizarea individuală și în practica clinică, acești compuși chimici pot fi toxici și/sau pot provoca unele reacții adverse, în special dacă sunt folosiți o perioadă îndelungată de timp sau inadecvat.

Mai mult, la o utilizare de lungă durată a preparatelor antibacteriene se poate dezvolta rezistența bacteriană, fie prin intermediul unor adaptări fenotipice instabile sau a unei alterări genetice stabile [3]. Așadar, unele produse indicate frecvent pentru a preveni invazia biofilmelor microbiene influențează ecosistemul cavității orale și a tractului digestiv [3, 7, 12, 24, 34], dezvoltă rezistența bacteriană sau produc alte efecte adverse, fapt care impulsionează elaborarea unor terapii antibacteriene alternative. Fenomenul de rezistență a microorganismelor din biofilme la tratamentul antimicrobian a impulsionat cercetările în scopul elaborării terapiei alternative la care bacteriile nu vor putea să dezvolte rezistență [11, 17, 22, 33]. Exemple de astfel de terapii relativ noi sunt administrarea bacteriofagilor și aplicarea terapiei fotodinamice antimicrobiene [18].

Terapia fotodinamică antimicrobiană (TFDA) se bazează pe reacții fotochimice declanșate de interacțiunea unei substanțe fotosensibile (fotosensibilizator – FS) și lumina cu o anumită lungime de undă în prezența oxigenului în țesut, având ca rezultat formarea speciilor reactive ale oxigenului (SRO) [11, 18, 21]. Efectul fotodinamic distructiv are un caracter localizat, acțiunea bactericidă fiind limitată de zona acțiunii iradierii laser sau LED,  $\leq 0,02 \mu\text{m}$  [14]. Astfel, în momentul când un FS absoarbe un foton, un electron tre-

ce de la starea inițială la o stare excitată, singletică a moleculei. Într-o perioadă foarte scurtă de timp, circa  $10^{-10}$ - $10^{-12}$  s, molecula excitată furnizează un surplus de energie electronică și vibratorie mediului înconjurător [4, 11, 14, 18, 21, 23, 26].

În urma impactului fotodinamic survine lezarea celulei bacteriene pe două căi: deteriorarea aparatului genetic și lezarea membranei citoplasmatică (MC), urmată de dezintegrarea componentelor celulare, inactivarea proteinelor de transport sau a enzimelor MC [11, 21]. Se presupune că prin iradierea unei zone limitate a macroorganismului, impactul fotodinamic poate atinge nu numai agentul infecțios, dar și microorganismele simbiotice. S-a constatat că TFDA nu doar distruge bacteriile, dar contribuie și la detoxifierea endotoxinelor, cum ar fi lipopolizaharidele, prin urmare, nu mărește producerea citokinelor proinflamatorii de către celulele mononucleare. Astfel, TFDA inactivează endotoxinele prin scăderea activității lor biologice [23].

Până în prezent a fost cercetat minuțios impactul TFDA asupra diferitor specii de bacterii în condiții *in vitro*. Un număr impunător de studii au elucidat că fototerapia, în combinație cu aplicarea metilenului albastru și albastrului de toluidină, este eficientă în distrugerea microorganismelor din componența biofilmului oral: *Streptococcus sanguis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Actinobacillus (Haemophilus) Actinomycetemcomitans*, *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus casei*, *Streptococcus sobrinus* și *Actinomyces viscosus* [4, 14, 26, 30, 33].

Actualmente, TFDA reprezintă o metodă terapeutică adjuvantă în tratamentul gingivitelor, parodontitelor, periimplantitelor, stomatitelor, cheilitelor, cariei dentare și complicațiilor acesteia, și altor afecțiuni ale cavității orale. Conform cercetărilor efectuate de un număr mare de autori, la aplicarea TFDA se reduce numărul de bacterii patogene cu 92-100%, timp de 24 ore după efectuarea terapiei fotodinamice numărul de microorganisme se reduce de 10 ori [21] fără a utiliza preparate antiseptice și antibiotice care pot provoca reacții adverse [11, 21]. Studiile de ultimă oră atestă restabilirea echilibrului fiziologic între microflora aerobă și cea anaerobă a cavității bucale după efectuarea TFDA într-un raport de 75:25% [23].

În cercetările efectuate de mai mulți autori s-a constatat că efectul bactericid al TFDA asupra microflorei cavității orale este în funcție de tipul sau concentrația FS, parametrii iradierii laser sau LED, condițiile de localizare și forma de organizare a microorganismelor [21]. La ora actuală este cunoscută o varietate largă de FS (albastru de toluidină, albastru de metilen, radohlorin, fotolon, fotodithazină ș.a.) utilizați în TFDA a afecțiunilor cavității orale, care s-au dovedit a fi eficienți în suprimarea atât a bacte-

riilor gram-pozitive, cât și a celor gram-negative [4, 14]. Studiile efectuate în condiții *in vitro*, experimentale și clinice, au demonstrat că TFDA distruge eficient și total microorganismele din biofilmul oral care provoacă afecțiunile parodontiului, CD și alte maladii stomatologice [4, 11, 14, 18, 21, 26], deși unele date sunt contradictorii [23].

Analiza datelor literaturii de specialitate de ultimă oră ne-a permis să concluzionăm că TFDA nu distruge selectiv unele specii, în majoritatea cazurilor având loc lichidarea în totalitate a florei existente. TFDA exercită un efect antibacterian asupra bacteriilor gram-pozitive, gram-negative și a fungiilor, provocând în egală măsură distrugerea microorganismelor aerobe, a celor facultativ-anaerobe și anaerobe [4, 11, 14, 18, 21, 23, 26, 30]. Pentru a obține rezultate optime după efectuarea TFDA este important de a lua în considerare condițiile de aplicare a substanțelor fotosensibile: tipul celulei cu care se vor lega, concentrația la care FS manifestă eficiență maximă, lungimea de undă și intensitatea iradierii laser sau LED necesare pentru activarea fotosensibilizatorilor, solubilitatea lor în lichidele și lipidele înconjurătoare și gradul de ionizare a acestora [14].

Avantajul aplicării TFDA constă în posibilitatea anihilării strict localizate a celulelor bacteriene amplasate atât la suprafață, cât și în spațiile intercelulare, fără survenirea unor reacții adverse asupra zonelor adiacente [14, 21, 23, 26]. Un avantaj incontestabil al TFDA vizavi de antibioterapie este caracterul multiplu al distrugerii oxidative a celulelor microbiene țintă, care previne formarea rezistenței la curele ulterioare [11, 14, 18, 21, 23, 26]. Astfel, în viitorul apropiat, TFDA poate deveni o alternativă eficientă și progresistă a metodelor tradiționale de tratament antibacterian. În același timp, utilizarea TFDA oferă noi oportunități pentru corecția numărului reprezentanților microflorei normale, stimulării biologice a proceselor ce se desfășoară în cadrul comunității microbiene [18].

La moment, majoritatea studiilor au relatat efectul TFDA asupra microorganismelor din biofilmul dentar în condiții *in vitro* sau experimentale, iar eficiența TFDA în prevenirea CD în condiții clinice este menționată doar în câteva lucrări, opiniile autorilor fiind controversate [4, 23]. Cauza numărului redus de studii sunt efectele secundare ale utilizării FS de natură chimică. În prezent se efectuează cercetări pentru identificarea substanțelor FS printre derivații clorinelor, bacterioclorinelor, purpurinelor, benzoporfirinelor, texafirinelor, etiopurpurinelor și ftalocianinelor [30-32]. FS aplicate în concentrații mici sunt dezactivate rapid de lichidul oral, iar utilizate în concentrații mai mari pot fi toxice pentru țesuturile înconjurătoare

ale cavității orale. Din această cauză, rămâne actual studiul și elaborarea noilor agenți de FS, care ar exercita o acțiune fotodestructivă asupra bacteriilor, suficientă pentru a asigura controlul biofilmului oral, dar fără a avea efecte nocive asupra țesuturilor cavității orale.

În studiile noastre anterioare efectuate în condiții *in vitro* și experimentale a fost demonstrat efectul TFDA asupra biofilmului oral, manifestat prin anihilarea sau reducerea semnificativă a numărului și activității tulpinilor bacteriene cariogene [28-32]. În cadrul acestui studiu ne-am propus să evaluăm în condiții clinice acțiunea comparativă a aplicării TFDA cu utilizarea a două tipuri de substanțe fotosensibile asupra biofilmului dentar la copiii convențional sănătoși cu risc carios mare sau extrem cauzat de activitatea cariogenă sporită a plăcii bacteriene.

### Material și metode de cercetare

Studiul a fost realizat în cadrul Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova. Pentru realizarea obiectivului studiului a fost constituit un eșantion din 120 de copii psihosomatic sănătoși cu vârste cuprinse între 7 și 12 ani și cu risc carios mare sau extrem cauzat de activitatea cariogenă sporită a biofilmului dentar. Copiii au fost repartizați aleatoriu în 4 loturi identice după structură, raportul între loturi fiind 1:1:1:1.

*Criteriile de selectare a subiecților în studiu:* vârsta 7- 12 ani, copii sănătoși cu risc carios mare sau ex-

trem cauzat de activitatea sporită a tulpinilor bacteriene cariogene din biofilmul dentar (scorul *Cariogram* 40,0%, numărul *Streptococcus mutans*  $>10^5$  UFC/ml, viteza ridicată și foarte ridicată de acumulare a plăcii bacteriene, PFRI  $>30\%$ ), acordul informat al părinților sau reprezentanților legali pentru participare în studiu.

*Criteriile de excludere a subiecților din studiu:* lipsa acordului informat al părinților sau reprezentanților legali pentru participarea în studiu, fluoroza dentară, sensibilitatea individuală la fototerapie sau la agentul de fotosensibilizare utilizat, administrarea tratamentului antimicrobian, participarea copiilor la alte programe de prevenire a CD.

Studiul dat a fost efectuat în două etape (A și B):

A – evaluarea efectului TFDA asupra cantității și compoziției biofilmului dentar timp de 30 de zile;

B – aprecierea eficienței TFDA urmată de administrarea probioticelor pe o durată de 6 luni.

Copiii din toate loturile au fost instruiți în tehnica igienizării cavității orale. Igiena orală a fost realizată de copii zilnic, utilizând obiecte și remedii de igienă corespunzătoare vârstei. În funcție de metodele preventive aplicate (*tabelul 1*), subiecții au fost repartizați aleatoriu în 4 loturi identice după gen, vârstă și mediul de trai.

În decursul etapei A a studiului, la copiii din loturile de cercetare ( $L_1$  și  $L_2$ ) a fost efectuată TFDA, eficiența căreia a fost comparată cu utilizarea apei de gură cu efect antiplacă (lotul  $L_3$ ) și lotul martor ( $L_4$ ). În calitate de agent de fotosensibilizare (AF)

*Tabelul 1.*

### Metodologia studiului

Durata etapei	Lotul de studiu	Metodele preventive aplicate
A, 30 de zile	$L_1=30$	Educația sanitară și instruirea igienică. Igienizarea cavității orale. Efectuarea TFDA: agent de fotosensibilizare (AF) – 0,1 ml soluție de albastru de metilen 1%; sursă de lumină (SL) – emițător de lumină LED, $\lambda=625-635$ nm
	$L_2=30$	Educația sanitară și instruirea igienică. Igienizarea cavității orale. Efectuarea TFDA: AF – 0,1 ml extract din struguri; SL – emițător de lumină LED cu emisia $\lambda=625-635$ nm
	$L_3=30$	Lotul de control: educația sanitară și instruirea igienică. Igienizarea cavității orale. Utilizarea apei de gură cu efect antiplacă
	$L_4=30$	Lotul martor: educația sanitară și instruirea igienică. Igienizarea cavității orale
B, 6 luni	$L_1=30$	Educația sanitară și instruirea igienică. Igienizarea cavității orale. Efectuarea TFDA (AF – 0,1 ml soluție de albastru de metilen 1%; SL – emițător de lumină LED, $\lambda=625-635$ nm) urmată de administrarea preparatelor probiotice
	$L_2=30$	Educația sanitară și instruirea igienică. Igienizarea cavității orale. Efectuarea TFDA (AF – 0,1 ml extract din struguri, SL – emițător de lumină LED, $\lambda=625-635$ nm) urmată de administrarea preparatelor probiotice
	$L_3=30$	Lotul de control: educația sanitară și instruirea igienică. Igienizarea cavității orale. Utilizarea apei de gură cu efect antiplacă
	$L_4=30$	Lotul martor: educația sanitară și instruirea igienică. Igienizarea cavității orale

etalon, la copiii din lotul  $L_1$  a fost utilizată soluția de albastru de metilen 1%, iar la cei din lotul  $L_2$  extractul din struguri. Durata acestei etape de studiu a fost de 30 de zile. La etapa B s-a evaluat eficiența utilizării TFDA, urmată de administrarea probioticelor, în prevenirea CD la copiii cu risc carios mare sau extrem cauzat de activitatea cariogenă sporită a biofilmului dentar. Studiul a continuat la aceiași copii după algoritmul descris mai sus. La copiii din loturile  $L_1$  și  $L_2$ , după distrugerea totală a biofilmului dentar prin efectuarea TFDA, s-au badijonat suprafețele dentare cu o suspensie care conține bacterii vii (*Lactobacillus rhamnosus GG*® și *Bifidobacterium BB-12*®) și s-au administrat pe cale orală preparate probiotice timp de 30 de zile. Durata totală a acestei etape de studiu a constituit 6 luni.

Terapia fotodinamică antibacteriană a fost efectuată după înlăturarea completă a depozitelor dentare. Pe suprafețele dentare și în spațiile interdentare s-a aplicat o substanță de FS (0,1 ml extract antocianic 5%, pH 8,0-9,0) pe 1-2 min, apoi s-au iradiat suprafețele tratate timp de 30 sec cu lumină LED,  $\lambda = 625-635$  nm și puterea impulsului 2,0-3,0 W emisă de dispozitivul *FotoSan 630 LAD pen* (CMS Dental, Denmark). Pentru protejarea aparatului vizual al personalului medical și al pacienților au fost folosiți ochelari speciali de protecție (FotoSan 625-635 nm). TFDA a fost urmată de administrarea probioticelor (*Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium bifidum* -  $4,9 \times 10^9$  UFC) o dată în zi în decurs de 20 zile.

Predicția cariei dentare și evaluarea complexă a riscului carios a fost efectuată cu aplicarea *Software Cariogram*. În cadrul acestei cercetări s-au efectuat metode directe de diagnostic microbiologic: determinarea numărului total de germeni în 1 g de biofilm dentar (NTG/g) și examenul bacteriologic după metodele standard. Identificarea bacteriilor a fost efectuată cu utilizarea sistemului automat *Vitek2* (bioMérieux, USA), utilizând cartela GPI care permite identificarea a 49 de specii printre care stafilococi și streptococi. Cercetările au fost efectuate în secția de microbiolo-

gie a laboratorului de diagnostic „Micromed”, Chișinău.

Studiul a fost aprobat de Comitetul de Etică a cercetării a USMF „Nicolae Testemițanu” și realizat în conformitate cu cerințele etice, cu obținerea acordului scris al părinților copiilor sau reprezentanților lor legali. Analiza datelor de statistică descriptivă și folosind teste parametrice și non-parametrice a fost realizată utilizând programele EXCEL și Epi Info cu ajutorul funcțiilor și modulelor acestor programe.

### Rezultate și discuții

La examinarea inițială, toți copiii incluși în cercetare prezentau risc carios mare, șansele de evitare a apariției cavitațiilor carioase noi variind între  $27,2 \pm 4,08\%$  și  $32,53 \pm 3,57\%$ .

Rezultatele determinării NTG/g de biofilm dentar la etapa inițială și după efectuarea măsurilor preventive sunt prezentate în *tabelul 2*. Astfel, în debutul studiului, între loturile de cercetare și martor nu s-au depistat diferențe semnificative statistic. Imediat după efectuarea TFDA s-a constatat anihilarea tuturor tulpinilor cariogene din biofilmul dentar în  $L_1$  (NTG/g = 0,0 UFC/g), iar în  $L_2$  (NTG/g =  $0,033 \pm 0,033 \log_{10}$  UFC/g) prezența bacteriilor a fost constatată doar la 1 copil ( $3,333 \pm 3,275\%$ ). Mai puțin eficientă a fost utilizarea apei de gură cu efect antiplacă, la  $43,33 \pm 9,047\%$  dintre copiii din lotul  $L_3$  fiind identificate NTG/g =  $0,47 \pm 0,104 \log_{10}$  UFC/g bacterii. Igienizarea cavității orale fără utilizarea altor metode de control al biofilmul dentar a avut cea mai redusă acțiune asupra tulpinilor cariogene din biofilmul dentar, NTG/g =  $1,033 \pm 0,176 \log_{10}$  UFC/g, bacteriile fiind depistate la  $56,667 \pm 9,047\%$  dintre copiii din lotul  $L_4$  (*tabelul 2*).

La 30 de zile după tratamentul preventiv, la majoritatea copiilor s-a depistat restabilirea numărului total de microorganisme (până la  $1,0 \times 10^8$  UFC/g) și peisajului microbial al biofilmului dentar, ponderea mare a *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, precum și asocierea tulpinilor de streptococi (loturile  $L_1$ ,  $L_2$  și  $L_4$ ). Doar în lotul de copii, care au beneficiat de igienizarea

*Tabelul 2.*

#### Numărul total de germeni în biofilmul dentar ( $\log_{10}$ UFC/g) la copii în funcție de măsurile preventive aplicate (etapa A)

Etapa studiului	$L_1=30$	$L_2=30$	$L_3=30$	$L_4=30$
Inițial (debutul studiului)	$8,133 \pm 0,104$	$8,167 \pm 0,097$	$8,1 \pm 0,100$	$8,2 \pm 0,088$
Imediat după ședința preventivă	0,0	$0,033 \pm 0,033$	$0,47 \pm 0,104$	$1,033 \pm 0,176$
6-7 zile	$6,967 \pm 0,112$	$6,067 \pm 0,106$	$6,2 \pm 0,088$	$7,99 \pm 0,074$
14 zile	$7,933 \pm 0,095$	$7,967 \pm 0,089$	$6,133 \pm 0,093$	$7,93 \pm 0,089$
30 zile	$8,017 \pm 0,079$	$7,90 \pm 0,074$	$6,067 \pm 0,095$	$7,91 \pm 0,074$
t, p inițial/30 zile	$2,504, p < 0,05$	$2,112, p < 0,05$	$6,998, p < 0,001$	$0,214, p > 0,05$

Tabelul 3.

**Numărul total de germeni în biofilmul dentar la copii ( $\log_{10}$  UFC/g)  
în funcție de măsurile preventive aplicate (etapa B)**

Etapa studiului	L <sub>1</sub> =30	L <sub>2</sub> =30	L <sub>3</sub> =30	L <sub>4</sub> =30
Inițial (debutul studiului)	8,133±0,104	8,167±0,097	8,1±0,100	8,20±0,088
Imediat după ședința preventivă	0,0	0,0	0,451±0,133	0,784±0,112
6-7 zile	6,10±0,056	6,233±0,092	6,30±0,085	7,92±0,085
14 zile	6,10±0,056	6,2±0,074	6,967±0,169	7,933±0,097
6 luni	6,133±0,079	6,34±0,088	7,03±0,169	7,867±0,063
t, p initial/6 luni	7,883, p<0,001	12,794, p<0,001	0,494, p>0,05	0,340, p>0,05

cavității orale și gargarisme zilnice cu ape de gură cu efect antiplacă, după o lună s-a constatat reducerea statistic semnificativă a NTG/g până la 6,067±0,095  $\log_{10}$  UFC/g t=6,998, p<0,001, comparativ cu etapa inițială a studiului. Simultan cu reducerea numărului de *Streptococcus mutans* și *Streptococcus sobrinus* a scăzut semnificativ numărul bacteriilor saprofite *Streptococcus salivarius* și *Streptococcus sanguis* și a rămas nemodificat numărul de copii la care s-au depistat asocierile *Streptococcus mutans* + *Streptococcus sobrinus* și *Streptococcus mutans* + *Streptococcus sobrinus* + *Streptococcus oralis*. Prin urmare, aplicarea doar a tratamentului antimicrobian nu este eficientă în reducerea agresivității biofilmului dentar la copiii cu risc carios mare sau extrem, cauzat de activitatea sporită a tulpinilor bacteriene cariogene.

Luând în considerare instituirea unei comunități microbiene constante în cavitatea orală la copiii de vârstă fragedă și ante-preșcolară, datorită utilizării probioticelor [164-169], am presupus că am putea efectua un tratament antimicrobian combinat. Acesta a inclus distrugerea totală a biofilmului dentar prin efectuarea TFDA, aplicarea prin tamponament ușor a 2-6 picături de produs probiotic care conține

*Bifidobacterium BB-12*<sup>®</sup>, *Lactobacillus rhamnosus GG*<sup>®</sup>– 250 x 10<sup>8</sup> UFC. În decurs de 30 de zile s-au administrat *per os* produse probiotice care conțin *Lactobacillus rhamnosus-LGG*, *Bifidobacterium BB-12* – 4,9×10<sup>9</sup>, 1-2 capsule/zi timp de 30 de zile [239, 240]. Pentru a evalua eficiența utilizării combinate a TFDA și probioticelor (loturile L<sub>1</sub> și L<sub>2</sub>) în îngrijirea preventivă a copiilor cu risc carios mare sau extrem, cauzat de activitatea cariogenă sporită a biofilmului dentar, a fost continuat acest studiu în decurs de 6 luni, după algoritmul descris anterior (etapa B).

Imediat după efectuarea TFDA suplimentată cu probiotice, la copiii din loturile L<sub>1</sub> și L<sub>2</sub> s-a depistat anihilarea totală a tuturor bacteriilor din biofilmul dentar, urmată de creșterea ulterioară a NTG/g, astfel încât timp de 14-30 de zile NTG/g să atingă nivelurile normei și să se mențină în decurs de 6 luni: 6,133±0,079  $\log_{10}$  UFC/g, t=7,883, p<0,001 în lotul L<sub>1</sub> și 6,34±0,088  $\log_{10}$  UFC/g, t=12,794, p<0,001 în lotul L<sub>2</sub> (tabelul 3).

S-a depistat modificarea peisajului microbial al biofilmului dentar caracterizată de scăderea statistic semnificativă a numărului *Streptococcus mutans* și *Streptococcus sobrinus* în biofilmul dentar, simultan

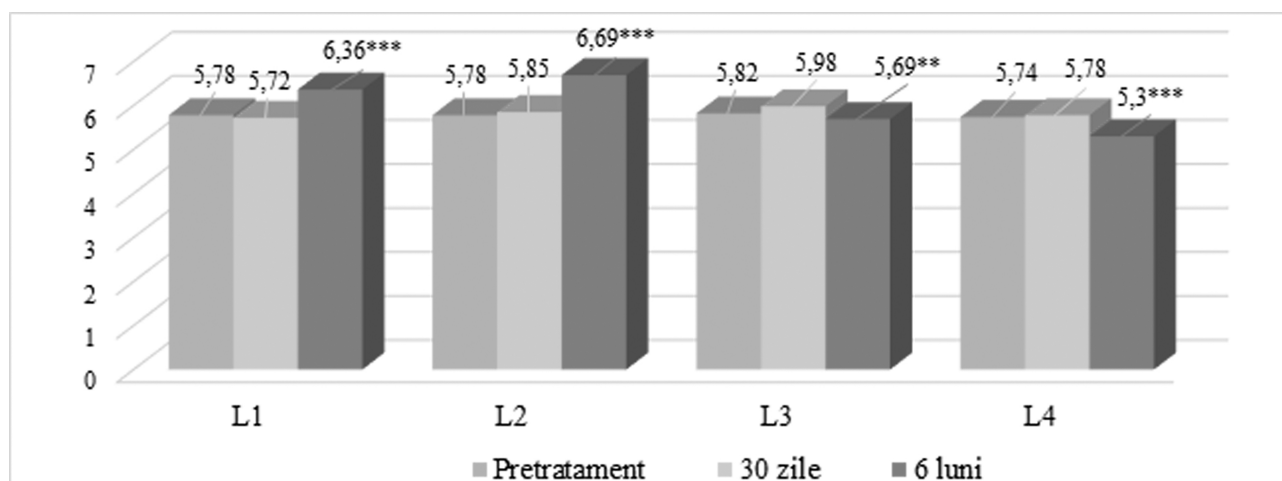


Figura 1. pH-ul biofilmului dentar la copii până și după efectuarea măsurilor cariopreventive

Notă: Veridicitatea diferențelor comparativ cu etapa inițială: \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001.

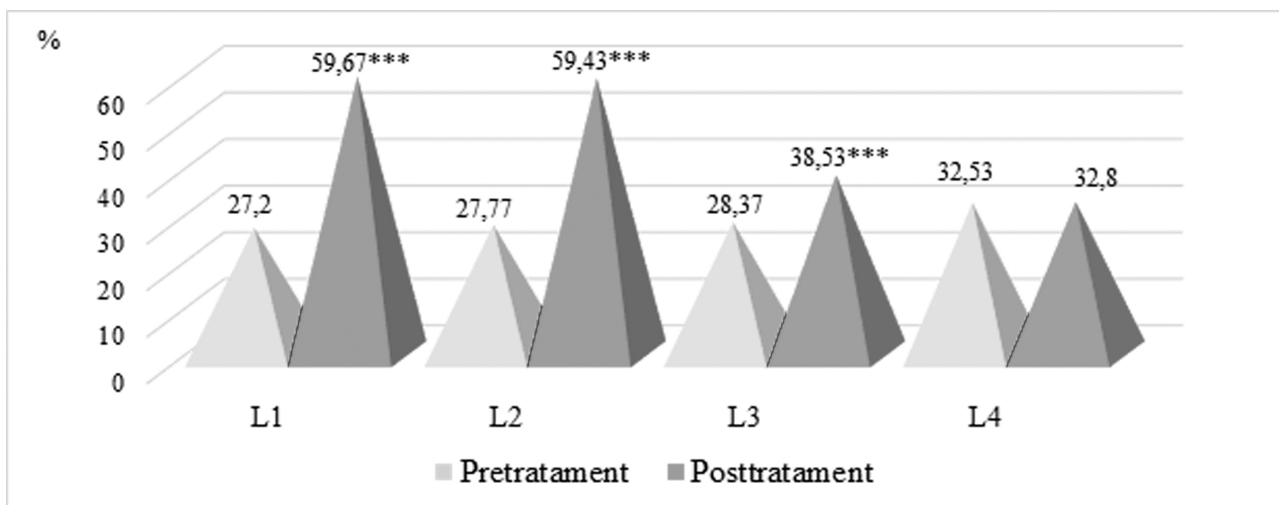


Figura 2. Șansele de evitare a cavitațiilor carioase noi (%) la copii până și după efectuarea măsurilor cariopreventive  
Notă: Veridicitatea diferențelor comparativ cu etapa inițială: \*\*\*  $p < 0,001$ .

cu creșterea statistic semnificativă a numărului de *Streptococcus salivarius* și *Streptococcus sanguis* în raport cu nivelul inițial și loturile  $L_3$  și  $L_4$  posttratament. În urma tratamentului preventiv efectuat, în  $L_2$  nu s-au depistat asocierile agresive ale streptococilor: *Streptococcus mutans* + *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus mutans* + *Streptococcus sobrinus* + *Streptococcus salivarius* și *Streptococcus mutans* + *Streptococcus sobrinus* + *Streptococcus oralis* care la debutul studiului au redus pH-ul biofilmului dentar până la nivelul critic ( $5,74 \pm 0,105$ ).

În urma îngrijirilor preventive efectuate a crescut semnificativ pH-ul biofilmului dentar (Figura 1) de 1,1 ori ( $p < 0,001$ ) la copiii din lotul  $L_1$ , și de 1,16 ori, ( $p < 0,001$ ) în  $L_2$ , diminuând capacitatea cariogenă a biofilmului dentar, asigurând reducerea considerabilă a riscului carios și majorând semnificativ efectul carioprotector, șansele de evitare a apariției cavitațiilor carioase crescând de 2,194 ori ( $p < 0,001$ ) în lotul  $L_1$  și de 2,14 ori ( $p < 0,001$ ) în  $L_2$  (figura 2).

Astfel, presupunem că substituția prin concurență a tulpinilor acidogene și cu grad sporit de capacitate cariogenă cu tulpini saprofite, care nu provoacă degradarea enzimatică a hidrocarbonaților și reducerea critică a pH-ului biofilmului dentar, contribuie la constituirea unei comunități microbiene fiziologice în cavitatea orală pe o perioadă de 3-6 luni și reduce sau previne stările de dezechilibru microbial [5, 6, 9, 16, 28, 29, 32].

Gargarismele cu ape de gură cu efect antiplacă s-a soldat cu reducerea semnificativă a NTG/g în decurs de o lună, iar în următoarele 5 luni s-a constatat creșterea semnificativă a NTG/g până la  $7,03 \pm 0,169 \log_{10}$  UFC/g, rezultatele nefiind statistic semnificative în raport cu cele inițiale ( $t=0,494$ ,  $p > 0,05$ ), aceste valori depășind semnificativ nivelul NTG/g estimat în loturile  $L_1$  și  $L_2$ . A fost constatată creșterea ponderii

copiilor cu numărul de *Streptococcus mutans*  $> 6 \log_{10}$  UFC/g cu  $20 \pm 7,303\%$  și cu  $16,667 \pm 6,804\%$  a celor cu asocieri agresive ale streptococilor. Acest fapt ar putea fi provocat de selectarea tulpinilor microbiene rezistente în urma utilizării antisepticelor. În primele 30 de zile ale studiului, pH-ul biofilmului dentar a crescut de 1,027 ori ( $p < 0,01$ ), iar ulterior s-a redus de 1,023 ori în decurs de 6 luni, majorând și mai mult riscul carios, de 1,358 ori ( $p < 0,001$ ) [29, 32].

Igienizarea cavității orale fără aplicarea altor metode de control al biofilmului dentar a avut o acțiune redusă asupra tulpinilor cariogene din biofilmul dentar și în etapa a doua a studiului ( $\text{NTG/g} = 6,867 \pm 0,063 \log_{10}$  UFC/g,  $t=0,340$ ,  $p > 0,05$ ,  $p < 0,01$ ), numărul de copii care prezentau asocierile streptococilor fiind neschimbat. S-a estimat scăderea în continuare a pH-ului biofilmului dentar până la valorile critice ( $5,3 \pm 0,114$ ,  $p < 0,001$  în raport cu nivelul inițial), riscul carios majorându-se de 1,008 ori [32].

În decursul perioadei de observație nu au fost semnalate cazuri de efecte adverse sau complicații în urma îngrijirilor preventive efectuate.

Așadar, la această etapă a studiului s-au relevat cele mai importante reduceri ale riscului carios în urma efectuării TFDA, suplimentată cu utilizarea produselor probiotice, grație anihilării momentane a bacteriilor din biofilmul oral, substituiri prin concurență a tulpinilor acidogene (cu capacitate cariogenă sporită) cu tulpini saprofite, care nu provoacă degradarea enzimatică a hidrocarbonaților, fapt care a contribuit la constituirea unei comunități microbiene fiziologice în cavitatea orală pe o perioadă îndelungată de timp și prevenirea instituirii unui dezechilibru microbial [32].

Analizând datele din literatura de specialitate și rezultatele cercetărilor proprii, putem conchide că TFDA este o metodă de tratament care oferă numeroase avantaje, fiind o tehnică non-invazivă, fără sân-

gerare, care exclude necesitatea aplicării anesteziei locale. Poate fi aplicată în condiții de ambulator, cu efecte adverse minime, poate fi repetată, fiind lipsită de toxicitate cumulativă și timp de vindecare scurt. Spre deosebire de alte metode, care necesită tratamente pentru perioade mai îndelungate de timp și provoacă unele efecte secundare, în TFDA durata tratamentului este mult mai redusă. Prezintă importanță faptul că în timpul TFDA sunt afectate numai celulele sensibilizate (în care s-au acumulat derivații porfirinici) și nu este afectat țesutul adiacent. Eficiența metodei nu este influențată de sensibilitatea microorganismelor la preparatele antibacteriene, sunt distruse inclusiv tulpinile microbiene antibiorezistente și bacteriile persistente în biofilme. Eliminarea bacteriilor are loc foarte rapid, în câteva minute. TFDA are un spectru larg de acțiune asupra tuturor agenților patogeni microbieni, efectul antibacterian nu se reduce în timp în cazul ședințelor repetate. Acțiunea bactericidă are un caracter local, nu exercită efect nociv asupra florei saprofite a întregului organism [14, 18, 21, 26].

Conform rezultatelor studiilor efectuate de Hrynash H. și coaut., 2014 și Kim D. și coaut., 2015, flavonoizii, care se conțin și în extractul din struguri, nu irită mucoasa cavității orale, nu provoacă reacții alergice de tip lent sau imediat, nu exercită acțiune citotoxică, nu are acțiune mutagenă, fapt care exclude probabilitatea selectării tulpinilor microbiene rezistente [10, 13]. În studiul nostru clinic, la copiii convențional sănătoși s-a stabilit eficiența superioară, comparativ cu utilizarea etalonului, a extractului din struguri în calitate de AF în TFDA, soldată cu anihilarea microorganismelor cariogene – *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus sobrinus* ș.a. și asocierilor agresive ale streptococilor ceea ce reprezintă un pas important în elaborarea metodelor eficiente de micșorare a agresivității biofilmului dentar și controlul CD.

### Concluzii

Prezentul studiu a demonstrat eficiența înaltă a aplicării extractului antocianic în calitate de substanță de fotosensibilizare în TFDA, confirmată prin reducerea numărului și activității tulpinilor bacteriene cariogene din biofilmul oral. Astfel, elaborarea metodei de TFDA (cu aplicarea AF autohton de origine vegetală) suplimentată cu administrarea probioticelor ar putea contribui la o nouă abordare terapeutică în controlul biofilmului microbial dentar.

### Bibliografie

1. Aas J.A. et al. *Bacteria of Dental Caries in Primary and Permanent Teeth in Children and Young Adults*. Journal of Clinical Microbiology. 2008, nr.46(4), p.1407-1417. doi:10.1128/JCM.01410-07.
2. Adrian S. *Sistemul internațional de clasificare și*

*management al bolii carioase: recomandări clinice și terapeutice*. Colegiul Medicilor Dentisti Cluj, 2015. <http://www.centruereabilitareorala-umfiasi.ro/Files/e3ff126f-33d2-4e17-a4d3-38b740e59f69.pdf>.

3. Araujo P. et al. *Non-antibiotic approaches for oral applications. The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs FORMATEX*. 2015, p. 551-558.
4. Baptista A. et al. *Antimicrobial photodynamic therapy as a strategy to arrest enamel demineralization: a short-term study on incipient caries in a rat model*. Photochem Photobiol. 2012, nr.88(3), p. 584–589.
5. Bhardwaj S.B. *Probiotics and oral health: an update*. Int J Contemporary Dent. 2010, nr.1 (3), p. 116-
6. Bhushan J., Chachra S. *Probiotics – their role in prevention of dental caries*. J Oral Health Com Dent. 2010, nr.4(3), p. 78-82.
7. David C. *Therapeutic Mouthrinses: Reaching Beyond Mechanical Plaque Control for Reduction in Dental Plaque and Gingivitis*. Inside Dental Hygiene. June 2015 RN. [https://idh.cdeworld.com/courses/4922Therapeutic\\_Mouthrinses:Reaching\\_Beyond\\_Mechanical\\_Plaque\\_Control\\_for\\_Reduction\\_in\\_Dental\\_Plaque\\_and\\_Gingivitis](https://idh.cdeworld.com/courses/4922Therapeutic_Mouthrinses:Reaching_Beyond_Mechanical_Plaque_Control_for_Reduction_in_Dental_Plaque_and_Gingivitis)
8. Falsetta M., Klein M., Colonne P. și alții. *Symbiotic Relationship between Streptococcus mutans and Candida albicans Synergizes Virulence of Plaque Biofilms in vivo*. Deepe GS, ed. Infection and Immunity. 2014, nr. 82(5), p. 1968-1981. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3993459>.
9. Hasslöf P. *Probiotic Lactobacilli in the context of dental caries as a biofilm-mediated disease*. Printed by Print & Media Umeå, Sweden 2013, 67 p.
10. Hrynash H. et al. *Anthocyanin Incorporated Dental Copolymer: Bacterial Growth Inhibition, Mechanical Properties, and Compound Release Rates and Stability by 1H NMR*. International Journal of Dentistry. 2014, 289401. doi:10.1155/2014/289401.
11. Ichinose-Tsuno A. et al. *Antimicrobial photodynamic therapy suppresses dental plaque formation in healthy adults: a randomized controlled clinical trial*. In: BMC Oral Health. 2014, nr. 14(1), p. 152-162.
12. Kalesinskas P. et al. *Reducing dental plaque formation and caries development. A review of current methods and implications for novel pharmaceuticals*. Stomatologija. 2014, nr.16(2), p. 44-52.
13. Kim D. et al. *Cranberry Flavonoids Modulate Cariogenic Properties of Mixed-Species Biofilm through Exopolysaccharides-Matrix Disruption*. Kreth J, ed. PLoS ONE. 2015; 10(12): e0145844. doi:10.1371/journal.pone.0145844.
14. Klepac-Ceraj V. et al. *Photodynamic effects of methylene blue-loaded polymeric nanoparticles on dental plaque bacteria*. Lasers in Surgery and Medicine. 2011, 43(7), p. 600–606.
15. Kostakioti M., Hadjifrangiskou M., Hultgren S.J. *Bacterial Biofilms: Development, Dispersal, and Therapeutic Strategies in the Dawn of the Postantibiotic Era*. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine. 2013; nr. 3(4), p.: 10306. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3683961>.



16. Lazăr V. *Microbiologie medicală*. București: Ed. Univ., 2007, 188 p. <http://ru.scribd.com/doc/219419344/Recomandari-Actuale-in-Administrarea-Probiotice-lor-2#scribd>
17. Lear G., Lewis G.D. *Microbial Biofilms: Current Research and Applications*. Norfolk: Caister Academic Press, 2012, 220 p.
18. Mang T., Tayal D., Baier R. *Photodynamic therapy as an alternative treatment for disinfection of bacteria in oral biofilms*. *Lasers Surg Med*. 2012, nr. 44(7), p. 588-596.
19. Marsh P.D. *Role of the oral microflora in health*. *Microb Ecol Health Dis*. 2000, nr.12, p.130–137.
20. Marsh P.D. *Are dental diseases examples of ecological catastrophes?* *Microbiology*. 2003, nr. 149, p. 279–294. [PubMed]
21. Mârțu-Stefanache M., Solomon S., Mârțu S. *Terapia fotodinamică în controlul biofilmului microbial oral*. Date din literatură. *Romanian Journal of Medical and Dental Education* 2015, nr. 2(4), p. 17-26
22. Mihai A. și alții. *Biofilme microbiene în medicina dentară cu referire la reabilitarea implanto-protetică*. *Revista de chirurgie oro-maxilo-facială și implantologie*. 2010, nr. 1(1), p. 9–13.
23. Paschoal M., Duarte S., Santos-Pinto L. *Photodynamic antimicrobial chemotherapy for prevention and treatment of dental caries: a critical review*. *OA Dentistry*. 2013, nr.1, p.1-4.
24. Pentelescu C., Delean A., Pop D. și alții. *Biofilm Ring Test® – o nouă metodologie de evaluare in vitro a eficacității apelor de gură*. *Clujul Medical*. 2012, Vol. 85, nr. 3, p. 330-334.
25. Petersen P.E., Leous P. *The burden of oral disease and risks to oral health at global and regional levels*. *Medicina Stomatologica*. 2017, nr.1-2, p. 7-13.
26. Rolim J.P. et al. *The antimicrobial activity of photodynamic therapy against Streptococcus mutans using different photosensitizers*. *J Photochem Photobiol B*. 2012, nr.106, p. 40–46.
27. Short F., Murdoch S., Ryan R. *Polybacterial human disease: the ills of social networking*. *Trends in Microbiology*. 2014, nr. 22(9), p. 508-516. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4158425>.
28. Spinei A., Spinei I. *The antimicrobial activity of photodynamic therapy against Streptococci species in dental biofilm using different photosensitizers: an in vitro study*. 4th IEEE International Conference on e-Health and Bioengineering EHB. Iași, Romania. 2013, p. 841-844.
29. Spinei A., Spinei I. *Efectul in vitro al terapiei fotodinamice asupra biofilmului dentar*. *Medicina Stomatologică*. 2013, nr. 3 (28), p. 99-106. ISSN 1857-1328.
30. Spinei A. *Influența terapiei fotodinamice antimicrobiene asupra biofilmului cavității orale: revistă de literatură*. *Revista de Științe ale Sănătății din Moldova*. 2015, nr. 1 (3), p. 61-80.
31. Spinei A. *Caria dentară la copiii cu dizabilități*. Print-Caro, Chișinău, 2016, 275 p.
32. Spinei A. *Efectul terapiei fotodinamice antibacteriene asupra biofilmului dentar la copii*. *Revista Română de Stomatologie*. București. 2017, nr.1 (63), p. 16-21.
33. Stănescu F. și alții. *Biofilmul microbial ca formă de organizare și comunicare superioară a bacteriilor*. *Revista română de stomatologie*. 2012, nr.4, p. 284-290.
34. Stratul Ș.I. și alții. *Tehnologia Triclozan/copolimer – o actualizare a cercetărilor recente, bazată pe dovezi*. *Revista Română de Stomatologie*. 2014, vol. LX, nr. 3, p. 118-122.