

System FotoSan w terapii fotodynamicznej chorób przyzębia

Renata Samulak-Zielińska, Elżbieta Dembowska, Maria Wiernicka-Menkiszak

FotoSan system in photodynamic therapy of periodontal disease

Praca recenzowana

Z Zakładu Periodontologii Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie
Kierownik: dr hab. n. med. Elżbieta Dembowska
e-mail: renata_samulak@o2.pl

Streszczenie

Ze względu na bakteryjną etiologię chorób przyzębia w leczeniu periodontologicznym jest często konieczne stosowanie antybiotyków. Liczne ograniczenia antybiotykoterapii wymusiły jednak poszukiwanie alternatywnych rozwiązań. Jednym z nich jest przeciwbakteryjna chemioterapia fotodynamiczna, będąca formą terapii fotodynamicznej, w której wykorzystuje się współdziałanie fotouczulacza, światła oraz tlenu. W periodontologii fotouczulaczem z wyboru jest błękit toluidyny, używany również do przyżyciowego barwienia tkanek.

Summary

In view of the bacterial aetiology of periodontal disease, it is often necessary to use antibiotics in treatment. The various limitations of antibiotic therapy have, however, forced the search for alternative solutions. One of them is antibacterial photodynamic chemotherapy, this being a form of photodynamic therapy in which use is made of the combined use of photosensitizer, light and oxygen. In periodontology, the photosensitizer of choice is toluidine blue, used also for marking of vital tissues.

Hasła indeksowe: terapia fotodynamiczna, błękit toluidyny, zapalenie przyzębia

Key words: photodynamic therapy, toluidine blue, periodontal inflammation

Ze względu na bakteryjną etiologię chorób przyzębia w leczeniu periodontologicznym jest często konieczne stosowanie preparatów o działaniu przeciwbakteryjnym. Wzrastająca oporność mikroorganizmów, trudności związane z osiągnięciem odpowiedniego stężenia leku w płynie dziąsłowym oraz skutki uboczne antybiotykoterapii wymusiły jednak poszukiwanie alternatywnych rozwiązań (1). Jednym z nich jest przeciwbakteryjna chemioterapia fotodynamiczna (Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy, PACT), będąca formą terapii fotodynamicznej.

Polega ona na niszczeniu mikroorganizmów za pomocą reaktywnych form tlenu, które powstają w wyniku współdziałania trzech elementów: fotouczulacza, światła o długości fali odpowiadającej maksimum jego absorpcji oraz tlenu. Podstawowym założeniem terapii fotodynamicznej jest selektywne wiązanie fotouczulacza z komórkami docelowymi. Podatność mikroorganizmów na działanie PACT wynika z ich 25-30 razy mniejszych

rozmiarów w stosunku do keratynocytów, braku błony jądrowej oraz systemu obrony przed reaktywnymi formami tlenu. Fotouczulacze są również wolniej usuwane z wnętrza komórek bakteryjnych (2, 3). Fotosensybilizatory penetrują jednak tkanki przyzębia na głębokość odpowiadającą średnio dwóm warstwom komórek. Jest to korzystne w przypadku obecności periopato-genów mających zdolność inwazji w struktury przyzębia – *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* i *Porphyromonas gingivalis* (4, 5).

Zasady działania terapii fotodynamicznej

Po naświetleniu fotouczulacza źródłem światła o odpowiedniej długości fali dochodzi do wzbudzenia fotosensybilizatora, który reaguje w dwojaki sposób, w zależności od dostępności tlenu w środowisku reakcji. Przy niskim stężeniu tlenu zachodzi pierwszy typ reakcji nazywany mechanizmem wolnorodnikowym, w którym powstają wolne rodniki na skutek przekazania elektronu lub protonu przez fotouczulacz substancji ze swojego najbliższego otoczenia (5, 6). Wolne rodniki w krótkim czasie reagują z tlenem molekularnym (cząsteczkowym) rozpuszczonym w cytoplazmie lub znajdującym się zewnątrzkomórkowo. Powstają w ten sposób reaktywne formy tlenu (ROS, Reactive Oxygen Species), do których zalicza się rodnik ponadtlenkowy $O_2^{\bullet-}$, rodnik hydroksylowy $OH^{\bullet}$, rodnik wodoronadtlenkowy $HO_2^{\bullet}$ oraz nadtlenek wodoru H_2O_2 (7). Niszczą one błony komórkowe, enzymy, receptory oraz DNA (4, 5).

W środowisku bogatym w tlen zachodzi drugi typ reakcji będący

podstawą terapii fotodynamicznej. Wzbudzony fotouczulacz reaguje z tlenem molekularnym, który przechodzi w wysoce energetyczny, lecz nietrwały tlen singletowy (8). W krótkim czasie reaguje on z substancjami odpowiedzialnymi za utrzymanie integralności błon komórkowych. W trakcie terapii fotodynamicznej zachodzą oba typy reakcji jednocześnie. Przewaga jednego z nich zależy zarówno od dostępności tlenu, jak i rodzaju oraz stężenia fotouczulacza (9). Stosowanie błękitu metylenowego, różu bengalskiego, akrydyny i błękitu toluidyny wiąże się głównie z reakcjami typu II (5), a zieleni malachitowej z reakcjami typu I (10).

Znane jest ponad 400 substancji o działaniu fotouczulającym. Większość z nich pochodzi ze świata roślinnego. W PACT w periodontologii najczęściej stosuje się błękit metylenowy, błękit toluidyny i poli-L-lizyno-chlorynę e6 (11). Spośród nich chlorek toluidyny został uznany, na podstawie obecnego stanu wiedzy, za fotouczulacz z wyboru do przeciwbakteryjnej chemioterapii fotodynamicznej w wielu dziedzinach stomatologii (5).

Źródłem światła w przeciwbakteryjnej chemioterapii fotodynamicznej są lasery o niskiej mocy oraz – częściej – lampy LED ze względu na małe rozmiary i niewielkie koszty. Zapewniają one ponadto głębszą penetrację światła w głąb tkanek oraz mniejsze generowanie ciepła niż pozostałe źródła światła (12).

Właściwości błękitu toluidyny

Chlorek toluidyny, nazywany zazwyczaj błękitem toluidyny (TBO, toluidyne blue orto), należy do barwników fenotiazynowych. Łą-

czy się on z błonami komórkowymi *Procaryota* oraz komórkami eukariotycznymi o zmienionym i wadliwym materiale genetycznym. Właściwości te są wykorzystywane w przeciwbakteryjnej chemioterapii fotodynamicznej oraz diagnostyce zmian o potencjalnie nowotworowym charakterze (13).

Możliwość wybarwienia komórek tkanek podejrzanych o rozwój procesu nowotworowego wykorzystuje się od wielu lat. W tym celu stosuje się 0,5-2% wodne roztwory błękitu toluidyny (13, 14).

Intensywniejsze zabarwienie tkanek dysplastycznych w porównaniu z tkankami zdrowymi wynika ze zwiększonej liczby jąder komórkowych na jednostce powierzchni, z przewagi metabolizmu bez-tlenowego, istnienia szczelin między komórkami, które nie przylegają ściśle do siebie, oraz z obecności RNA w cytoplazmie i płynie komórkowym (13). Błękit toluidyny, ze względu na charakter hydrofilny, nie penetruje blaszki podstawnej nabłonka, dlatego zabarwienie głębszych warstw tkanek następuje tylko w warunkach przerwania ich ciągłości i powstania owrzodzenia (15). Ponadto wybarwieniu ulegają obszary hiperkeratynizacji oraz zmienione zapalnie (14). Jest to całkowicie bezpieczna metoda diagnostyczna. Wybarwiony błękitem toluidyny bioptat może być przygotowany do oceny histopatologicznej lub analizy metodą PCR (Polymerase Chain Reaction), gdyż w trakcie procedur przygotowawczych z łatwością jest wypłukiwany z preparatu. Ponadto TBO charakteryzuje nieszkodliwość wobec białek osocza, w tym układu odpornościowego i układu krzepnięcia (13). Jest również stosowany do dezyn-

fekcji krwi i produktów krwiopochodnych (16) oraz leczenia zatrucia aniliną. Jego zaletą jest także niska cena w porównaniu z innymi fotouczulaczami (17). Bezpieczeństwo stosowania błękitu toluidyny w diagnostyce zmian potencjalnie nowotworowych zachęciło do podjęcia próby jego zastosowania w PACT.

Błękit toluidyny ma strukturę kationową, dlatego łączy się zarówno z bakteriami Gram(+), jak i Gram(-). Małe rozmiary cząsteczki sprzyjają wiązaniu się z powierzchniami błon komórek docelowych (18). Jest pozbawiony smaku i zapachu. Z łatwością rozpuszcza się w wodzie, tworząc roztwór o niebieskofioletowym zabarwieniu, podczas gdy proszek ma barwę zieloną. Jego maksimum absorpcji wynosi 630 nm, mieszcząc się w zakresie promieniowania widzialnego w barwie czerwonej. Światło o tej długości fali penetruje tkanki na głębokość 5 mm, stąd ograniczenie do miejscowego stosowania preparatu (4). Z drugiej strony jest to bezpieczna długość fali, gdyż nie wiąże się z ryzykiem mutagenyzy związanym z promieniowaniem ultrafioletowym czy przegrzania tkanek jak przy promieniowaniu podczerwonym (8). Błękit toluidyny intensywniej się kumuluje w komórkach mikroorganizmów niż błękit metylenowy (19). Ma również spontaniczną tendencję do tworzenia dimerów, co zwiększa jego skuteczność wobec lipopolisacharydów i ułatwia wiązanie z błonami (18). W krótkim czasie łączy się z komórkami docelowymi (17). Już po 2 minutach od aplikacji i wypłukania roztworem fizjologicznym soli kieszonkę przyzębną można poddać działaniu światła (20). Błękit toluidyny działa głównie w reakcji II typu z wytworzeniem tlenu singletowego.

Wiążąc się z błonami komórkowymi, powoduje wzrost ich przepuszczalności (21). Potencjalne ograniczenia w stosowaniu mogą wynikać z faktu, że błękit toluidyny łączy się z transporterami wielolekowymi (MDR, multidrug resistance transporters) na powierzchni błon komórkowych mikroorganizmów, dlatego możliwy jest w teorii rozwój oporności wobec barwników fenotiazynowych (16).

Skuteczność TBO wobec mikroorganizmów zależy od stężenia fotouczulacza. Redukcję na poziomie 99,99% w warunkach laboratoryjnych zapewnia stosowanie roztworów o stężeniu 0,1%, niezależnie od dawki energii świetlnej. W zakresie stężeń 0,01-0,001% uzyskuje się 90-99% skuteczności (17). Qin i wsp. wykazali, że najlepszy efekt przeciwbakteryjny wobec periopatogenów pobranych od pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia zapewnia stosowanie roztworów o stężeniu 0,1% przy dawce energii 12J/cm² i mocy źródła światła 159mW/cm² (22). Luan i wsp. wykazali jednocześnie, że stosowanie takiego stężenia błękitu toluidyny jest bezpieczne dla tkanek przyzębia, gdyż nie powoduje zmian patologicznych w jego strukturach (23). Dörtbudak i wsp. uzyskali niemal całkowitą redukcję *Porphyromonas gingivalis* i *Prevotella intermedia*, stosując 0,01% błękit toluidyny u pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia (24). Wykazano również skuteczność tego stężenia wobec *Candida albicans* (25) oraz w leczeniu *periimplantitis* (26). Błękit toluidyny jest skuteczny również wobec *Streptococcus mutant* (27) i *Staphylococcus aureus* (28) oraz wobec patogenów bytujących w strukturach kanałów korzeniowych (29). Cechuje go również większa niż błękit metyleno-



Ryc. 1. Zestaw FotoSan: lampka i fotouczulacze o różnej gęstości.

wy efektywność działania wobec *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum* i *Porphyromonas gingivalis* oraz lipopolisacharydów (5).

Wyższe niż 0,1% stężenia błękitu toluidyny nie są skuteczne, gdyż nadmiar fotouczulacza pochłania energię świetlną, zanim dotrze ona do drobnoustrojów (16, 30). W obecnym czasie nie ma wystarczającej liczby klinicznych randomizowanych badań kontrolnych, aby jednoznacznie ocenić skuteczność metody. Wyniki badań laboratoryjnych zachęcają jednak do dalszych badań w tym kierunku.

Błękit toluidyny jest aktualnie uznany za fotouczulacz z wyboru do fotodezynfekcji tkanek w periodontologii. Systemy do fotodezynfekcji tkanek zawierające 0,01% błękit toluidyny to FotoSan (CMS Dental, Dania), Aseptim Plus (SciCan, Niemcy) i PAD Plus (Denfotex Light Systems Ltd., Szkocja). Dwa ostatnie mają jako źródło światła lampę diodową o mocy 50-100mW/cm², dlatego czas naświetlania jednej leczonej powierzchni musi wynosić 1-2 minuty.



Ryc. 2. Aplikacja fotouczulacza do wnętrza kieszonki.



Ryc. 3. Końcówka lampy w kształcie sondy periodontologicznej umieszczona we wnętrzu kieszonki przyzębnej.



Ryc. 4. Płaska końcówka lampy umieszczona na powierzchni dziąsła w rzucie korzenia.

Cechy charakterystyczne urządzenia do PACT

Zestaw do przeciwbakteryjnej chemioterapii fotodynamicznej do stosowania w wielu dziedzinach stomatologii FotoSan składa się z lampy LED o mocy 2000mW/cm^2 i fotouczulacza – błękitu toluidyny o stężeniu 0,1% w trzech różnych gęstościach (ryc. 1). Lampa generuje światło o długości fali 635 nm, a ze względu na moc jest możliwe skrócenie czasu naświetlania jednej powierzchni do 20 sekund. Trzy lepkości fotouczulacza: niski (low), średni (medium) i wysoki (high) różnią się zawartością ksantanu – substancji zagęszczającej, natomiast stężenie błękitu toluidyny nie ulega zmianie. Różne konsystencje umożliwiają stosowanie preparatu w różnych sytuacjach klinicznych: gęsty fotouczulacz z łatwością utrzymuje się na powierzchni błon śluzowych. Jest również przeznaczony do aplikacji do kieszonek z krwawieniem po skalingu. Z kolei postać o niskiej gęstości z łatwością penetruje strukturę kanału korzeniowego.

Procedura postępowania w przypadku przeciwbakteryjnej chemioterapii fotodynamicznej w stosunku do mikroorganizmów bytujących w kieszonkach przyzębnych głębszych niż 5 mm jest następująca: po przeprowadzeniu skalingu barwnik umieszcza się w kieszonce za pomocą strzykawki i igły z bocznym otworem, prowadząc igłę od dna do brzegu kieszonki (ryc. 2), unikając tworzenia pęcherzyków powietrza. Średnia ilość błękitu toluidyny potrzebna do wypełnienia jednej kieszonki wynosi 0,1-0,2 ml. Po 3 minutach od aplikacji (jest to czas potrzebny na związanie fotouczulacza z mikroorganizmami) kieszonkę należy przepłukać roztworem fizjologicznym soli. Pozwala to usunąć nadmiar barwnika niezwiązanego z bakteriami, który mógłby niepotrzebnie pochłonąć energię świetlną, zanim dotarłaby ona do komórek docelowych. Następnie do kieszonki wprowadza się końcówkę lampy z jednorazowym światłowodem w kształcie sondy periodontologicznej i naświetla jej wnętrze przez 10 sekund (ryc. 3). Końcówka wykonuje delikatne vibracje, dlatego dodatko-

we ruchy nie są konieczne. Następnie zmienia się końcówkę na płaską i naświetla powierzchnię dziąsła w rzucie kieszonki przez kolejne 10 sekund (ryc. 4). Naświetlanie zewnętrzne jest wystarczające w przypadku obecności kieszonek płytszych niż 5 mm. Po zabiegu kieszonki należy przepłukać roztworem fizjologicznym soli. Dla wzmocnienia efektu zaleca się 3-krotne powtórzenie zabiegu w ciągu tygodnia.

Podsumowanie

Potencjalne korzyści oraz bezpieczeństwo stosowania przeciwbakteryjnej chemioterapii fotodynamicznej zachęcają do wykorzystania jej właściwości w praktyce klinicznej zarówno w periodontologii, jak i endodoncji i stomatologii zachowawczej. Jej skuteczność powinna być jednak zweryfikowana rzetelnymi badaniami klinicznymi, mikrobiologicznymi i laboratoryjnymi.

Autorki dziękują firmie Marku Dental za umożliwienie wykorzystania systemu FotoSan.

PIŚMIENNICTWO

1. Maisch T.: Anti-microbial photodynamic therapy: useful in the future? *Lasers Med. Sci.*, 2007, 22, 2, 83-91.
2. Cassidy C.M. i wsp.: Drug delivery strategies for photodynamic antimicrobial chemotherapy: from benchtop to clinical practice. *J. Photochem. Photobiol. B.*, 2009, 4, 95, 2, 71-80.
3. Szulc M., Ziętek M.: Zastosowanie terapii fotodynamicznej w chorobach przyzębia – na podstawie piśmiennictwa. *Czas. Stomatol.*, 2007, 60, 8, 527-535.
4. Raghavendra M., Koregol A., Bhola S.: Photodynamic therapy: a targeted therapy in periodontics. *Aust. Dent. J.*, 2009, 54, 1, 102-109.
5. Takasaki A.A. i wsp.: Application of antimicrobial photodynamic therapy in periodontal and peri-implant diseases. *Periodontology 2000*, 2009, 51, 109-140.
6. Josefsen L.B., Boyle R.W.: Photodynamic therapy and the development of metal-based photosensitisers. *Met. Based Drugs.*, 2008, 276109.
7. Rutkowski R. i wsp.: Znaczenie reaktywnych form tlenu i azotu w patomechanizmie procesu zapalnego. *Pol. Merk. Lek.*, 2007, 23, 134 -131.
8. Konopka K., Gośliński T.: Photodynamic therapy in dentistry. *J. Dent. Res.*, 2007, 86, 8, 694-707.
9. Wawrzuta A. i wsp.: Czy terapia fotodynamiczna może być zastosowana do leczenia czerniaka? *Przegl. Dermatol.*, 2009, 96, 240-243.
10. Prates R.A. i wsp.: Bactericidal effect of malachite green and red laser on *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J. Photochem. Photobiol. B.*, 2007, 3, 86, 1, 70-76.
11. Ulatowska-Jarża, A. i wsp.: Porównanie antybakteryjnej aktywności fotodynamicznej in vitro protoporfiryny i fotofonu. *Acta Bio-Optica et Informatica Medica. Inżynieria Biomedyczna*, 2007, 13, 4, 361-367.
12. Podbielska H., Sieroń A., Stręk W.: Diagnostyka i terapia fotodynamiczna. Elsevier Urban & Partner, Wrocław 2004.
13. Florczak K., Emerich J., Staszewski A.: Rozszerzenie badania kolposkopowego o przyżyciowe barwienie błękitem toluidyny tarczy szyjki macicy – praca przeglądowa. *Ginekol. Prakt.*, 2003, 11, 6, 37-44.
14. Trąbska-Świsłelnicka M., Samulak-Zielińska r., Lipski M.: Biopsja w diagnostyce chorób jamy ustnej – na podstawie piśmiennictwa. *Czas. Stomatol.*, 2009, 62, 12, 953-961.
15. Kömerik N. i wsp.: Fluorescence biodistribution and photosensitising activity of toluidine blue o on rat buccal mucosa. *Lasers Med Sci.*, 2002, 17, 2, 86-92.
16. Tegos G. P., Hamblin M.R.: Phenothiazinium antimicrobial photosensitizers are substrates of bacterial multidrug resistance pumps. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2006, 50, 1, 196-203.
17. Lin J. i wsp.: Toluidine blue-mediated photodynamic therapy of oral wound infections in rats. *Lasers Med Sci.*, 2010, 25, 2, 233-238.
18. Demidova T.N., Hamblin M.R.: Photodynamic inactivation of *Bacillus* spores, mediated by phenothiazinium dyes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2005, 71, 11, 6918-6925.
19. Tseng S.P. i wsp.: Toluidine blue O photodynamic inactivation on multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Lasers Surg. Med.*, 2009, 41, 5, 391-397.
20. Wong T.W. i wsp.: Bactericidal effects of toluidine blue-mediated photodynamic action on *Vibrio vulnificus*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2005, 49, 3, 895-902.
21. Bhatti M. i wsp.: Exposure of *Porphyromonas gingivalis* to red light in the presence of the light-activated antimicrobial agent toluidine blue decreases membrane fluidity. *Curr. Microbiol.*, 2002, 45, 2, 118-122.
22. Qin Y. i wsp.: Toluidine blue-mediated photoinactivation of periodontal pathogens from supragingival plaques. *Lasers Med. Sci.*, 2008, 23, 1, 49-54.
23. Luan X.L. i wsp.: Histological evaluation of the safety of toluidine blue-mediated photosensitization to periodontal tissues in mice. *Lasers Med. Sci.*, 2009, 24, 2, 162-166.
24. Dörtbudak O. i wsp.: Photodynamic therapy of bacterial reduction of periodontal microorganisms. *J. Oral Laser Appl.*, 2001, 1, 115-118.
25. Souza R.C. i wsp.: Comparison of the photodynamic fungicidal efficacy of methylene blue, toluidine blue, malachite green and low-power laser irradiation alone against *Candida albicans*. *Lasers Med. Sci.*, 2009, DOI10.1007/s10103-009-0706-z.
26. Shibli J.A. i wsp.: Lethal photosensitization in microbiological treatment of ligature-induced peri-implantitis: a preliminary study in dogs. *J. Oral Sci.*, 2003, 45, 1, 17-23.
27. Zanin I.C. i wsp.: Susceptibility of *Streptococcus* mutants biofilms to photodynamic therapy: an in vitro study. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2005, 56, 2, 324-330.
28. Sharma M. i wsp.: Toluidine blue-mediated photodynamic effects on staphylococcal biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2008, 52, 1, 299-305.
29. Fonseca M.B. i wsp.: Photodynamic therapy for root canals infected with *Enterococcus faecalis*. *Photomed. Laser Surg.*, 2008, 26, 3, 209-213.
30. Moritz A. i wsp.: Oral Laser Application. Quintessence Publishing, Hanover Park, IL 2006.