

---

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

# Influența fumatului asupra sănătății orale

---

Doctorand: **Minodora Voinea**

---

Conducător de doctorat: **Prof. Dr. Radu Septimiu Câmpian**

---



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

# CUPRINS

<b>INTRODUCERE</b>	1
<b>STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII</b>	
<b>1. Fumatul - condiție medicală</b>	5
1.1. Date generale despre fumat	5
1.2. Nicotina	5
1.2.1. Proprietăți, metabolism și biomarkeri	5
1.2.2. Dependența nicotinică	6
1.2.3. Evaluarea fumătorilor	6
1.2.3.1. Diagnosticul clinic al dependenței nicotinică	6
1.2.3.2. Diagnosticul clinic al dependenței nicotinică	7
1.3. Efectele fumatului asupra stării generale de sănătate	8
1.4. Efectele fumatului asupra sănătății oro-dentare	9
1.4.1. Efectele fumatului asupra țesuturilor parodontale	9
1.4.2. Efectele fumatului asupra țesuturilor dentare	10
1.4.3. Fumatul - factor de risc în patologia oncologică din sfera oro-maxilo-facială	10
<b>2. Perspective pentru regenerarea tisulară prin intermediul celulelor stem mezenchimale derivate din structuri dentare</b>	11
2.1. Principiile ingineriei tisulare	11
2.1.1. Noțiuni generale	11
2.1.1.1. Ce înseamnă medicină regenerativă?	11
2.1.1.2. Scopul medicinei regenerative	11
2.1.1.3. Cum funcționează medicina regenerativă?	11
2.1.2. Tipuri de terapii celulare	12
2.1.2.1. Terapia prin implantare de celule	12
2.1.2.2. Terapia de inducție celulară	12
2.1.2.3. Suportul matriceal	13
2.1.3. Aplicațiile terapiilor regenerative în medicină	13
2.2. Celulele stem	14
2.2.1. Noțiuni generale	14
2.2.1.1. Definiția celulelor stem	14
2.2.1.2. Caracteristicile celulelor stem	14
2.2.1.3. Clasificarea celulelor stem	14
2.2.1.4. Surse de celule stem	16
2.2.2. Aplicațiile terapiilor celulare în medicină dentară	16
2.2.2.1. Regenerarea complexului dentină-pulpă dentară	17
2.2.2.2. Bioingineria dinților	17

2.2.2.3.Terapiile regenerative la nivelul pielii, mucoasei bucale, mușchilor faciali și a glandelor salivar	18
2.2.2.4.Terapiile regenerative la nivelul oaselor și articulației temporo-mandibulare	19
2.2.2.5.Regenerarea tisulară a parodonțiului	19
2.2.3 Implicarea celulelor stem derivate din țesuturi dentare în regenerarea parodonțiului	21
<b>3. Antioxidanți naturali polifenolici cu aplicabilitate în terapia regenerativă</b>	23
3.1. Implicațiile polifenolilor naturali în epigenetică	23
3.2. Polifenoli naturali implicați în terapia regenerativă	23
3.2.1. Curcumina	23
3.2.2. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG)	25
<b>CONTRIBUȚIA PERSONALĂ</b>	
<b>1. Ipoteza de lucru/obiective</b>	31
<b>2. Studiul 1 – Izolarea și caracterizarea celulelor stem din cavitatea orală – studiu <i>in vitro</i></b>	33
2.1. Introducere	33
2.2. Ipoteza de lucru/obiective	35
2.3. Material și metodă	35
2.4. Rezultate	42
2.5. Discuții	50
2.6. Concluzii	54
<b>3. Studiul 2 – Evaluarea viabilității și capacității de diferențiere osoasă a celulelor stem mezenchimale derivate din parodonțiul uman în urma expunerii la nicotină – studiu <i>in vitro</i></b>	55
3.1. Introducere	55
3.2. Ipoteza de lucru/obiective	55
3.3. Material și metodă	56
3.4. Rezultate	60
3.5. Discuții	68
3.6. Concluzii	72
<b>4. Studiul 3 – Evaluarea efectului protector al unor antioxidanți naturali asupra citotoxicității induse de nicotină pe celulele stem derivate din zona orală– studiu <i>in vitro</i></b>	73
4.1. Introducere	73
4.2. Ipoteza de lucru/obiective	74
4.3. Material și metodă	75
4.4. Rezultate	78
4.5. Discuții	82

4.6. Concluzii	87
<b>5. Studiul 4 - Corelații între dependența de nicotină, nivelul de monoxid de carbon din aerul exhalat și statusul de igienă orală – studiu <i>observațional</i></b>	89
5.1. Introducere	89
5.2. Ipoteza de lucru/obiective	90
5.3. Material și metodă	90
5.4. Rezultate	93
5.5. Discuții	99
5.6. Concluzii	100
<b>6. Concluzii generale</b>	101
<b>7. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei</b>	103
<b>REFERINȚE</b>	105
<b>ANEXE</b>	121

**Cuvinte cheie:** fumat, celule stem mezenchimale, țesuturi parodontale, polifenoli, citotoxicitate, igiena orală, monoxid de carbon, dependență nicotinică

## Introducere

La ora actuală, fumatul reprezintă o problemă de sănătate la nivel mondial, fiind demonstrat faptul că are efecte negative asupra întregului organism. La nivelul cavității orale, s-a demonstrat faptul că cele mai grave efecte sunt la nivel parodontal.

Boala parodontală reprezintă, la rândul ei, o problema globală de sănătate, având o etiopatogenie complexă, fumatul fiind un factor favorizant, influențând severitatea și evoluția leziunilor parodontale. Legătura dintre fumat și riscul apariției și dezvoltării bolii parodontale a fost intens cercetată, dar, la nivel tisular, mecanismele de degradare nu sunt complet elucidate.

Multiple studii desfășurate în ultimii ani afirmă faptul că nicotina, unul dintre cei mai importanți compuși toxici ai tutunului, inhibă proliferarea celulară, induce stresul oxidativ, iar organele sau țesuturile produc și evidențiază mediatori ai inflamației, fiind corelați cu creșterea resorbției osoase.

Având în vedere amploarea răspândirii fumatului, cât și a bolii parodontale în rândul populației, teza de doctorat își propune să cerceteze efectele administrării de nicotină la nivelul structurilor parodontale, precum și evaluarea răspunsului tisular la administrarea de compuși naturali polifenolici cu acțiune antioxidantă și antiinflamatoare la acest nivel.

## **STUDIUL 1 – Izolarea și caracterizarea celulelor stem din cavitatea orală – studiu *in vitro***

### **Obiective**

Demonstrarea caracterului de celule stem a celulelor recoltate din structuri tisulare parodontale umane de la nivelul ligamentului circular gingival, ligamentului parodontal, osului alveolar interradicular și gingiei, fiind cunoscut faptul că țesuturile parodontale reprezintă o sursă accesibilă și facilă de celule stem mezenchimale care pot reprezenta o platformă pentru medicina regenerativă.

### **Material și metodă**

Dupa recoltarea țesuturilor parodontale, in vederea izolării celulelor, fragmentele tisulare au fost transferate într-o eprubetă tip Falcon de 50 ml în 15 ml soluție de mediu complet conținând 10% ser fetal și transportate la laborator. Probele au fost păstrate la 4°C pana la procesare (maxim 24 ore). Pentru izolarea și cultivarea celulelor stem din țesuturile parodontale s-a folosit procesarea mecanică, prin mărunțirea fragmentelor tisulare cu instrumente sterile, filtrare și centrifugare, apoi au fost resuspendate și însămânțate în flaskuri Cole, respectând protocoalele de menținere în cultură și stocare pe termen scurt și lung. Ulterior, aceste celule au fost caracterizate fenotipic prin marcarea imunocitochimică, citometrie în flux și analiza genetică, evaluându-se și potențialul lor de diferențiere spre linii osteogenice, condrogenice și neuronale și, implicit, caracterul de celule stem mezenchimale.

Caracterizarea fenotipică s-a efectuat prin marcarea imunocitochimică cu anticorpi specifici celulelor stem mezenchimale. Colorațiile imunocitochimice evidențiază expresia acestor markeri de celule stem la suprafața sau în interiorul celulelor izolate.

Expresia markerilor de celule stem a fost investigată și prin citometrie în flux. Celulele au fost analizate cu ajutorul citometrului de flux BD FACS Canto II, 6-colour, utilizând software-ul BD FACS Diva versiunea 6.1.3.

Pentru evaluarea expresiei genelor pentru stemness prin reacția de polimerizare în lanț în timp real (RT-PCR) celulele au fost recoltate în TriZol și procesate pentru extracția ARN total prin metoda clasică cu fenol-cloroform. ARN-ul obținut a fost evaluat din punct de vedere cantitativ cu spectrofotometrul NanoDrop ND-1000 și calitativ cu Bioanalizorul Agilent 2100.

Pentru demonstrarea caracterului de celule stem mezenchimale, a fost realizată și diferențierea spre 3 linii celulare distincte. Astfel, pentru inducerea diferențierii osteogenice cele patru tipuri de celule studiate au fost însămânțate pe placi în mediu complet de celule stem, urmând protocolul de diferențiere osteogenică. Protocolul de diferențiere neuronală a cuprins două etape de diferențiere cu folosirea în prima etapă a unui mediu ce conține doi factori de creștere și suplimentți comerciali specifici diferențierii neuronale. În a doua etapă la mediul bazal s-au adăugat nicotinamidă, IBMX și Nerve Growth Factor pentru a susține o mai bună viabilitate a

celulelor. Pentru diferențierea condroblastică s-a folosit un protocol de diferențiere în care factorul de creștere TGFβ3 reprezintă elementul de bază al mediului de

diferențiere. Evaluarea diferențierii s-a realizat prin colorații imunocitochimice și colorația Alcian blue.

### **Rezultate**

În cazul colorațiilor imunocitochimice cu anticorpi monoclonali s-a observat că toate tipurile celulare au exprimat ALP, CD29, CD44, CD73 și negativitate pentru CD45. S-au constatat diferențe la expresia în ceea ce privește intensitatea pozitivității celorlalți markeri de stemness. La citometria în flux rezultatele au fost similare cu cele obținute la colorațiile imunocitochimice. Reacția de polimerizare în lanț în timp real (RT-PCR) a demonstrat expresia genică a BDNF, Nanog și Oct  $\frac{3}{4}$  în toate cele patru tipuri de celule. Potențialul de diferențiere al celulelor studiate a fost evaluat prin cultivarea acestora în mediu de diferențiere osteogenic, condrogenic și neuronal, demonstrându-se capacitatea de diferențiere spre alte trei linii celulare a tuturor tipurilor de celule luate în studiu.

### **Concluzii**

Acest studiu a demonstrat faptul că celulele stem izolate din țesuturi din cavitatea orală îndeplinesc criteriile obligatorii ca să fie încadrate în clasa de celule stem mezenchimale. Astfel, aceste celule se pot izola și multiplica relativ ușor *in vitro*, se pot conserva prin înghețare pe perioade îndelungate și reprezintă o potențială sursă pentru băncile de celule stem. Țesutul de proveniență al celulelor stem a determinat o heterogenitate de expresie a markerilor de stemness și procente diferite de pozitivitate a acestor markeri, aceste observații putând influența decizia folosirii în viitor a acestor celule stem în transplantologie.

## **STUDIUL 2 – Evaluarea viabilității și capacității de diferențiere osoasă a celulelor stem mezenchimale derivate din parodonțiul uman în urma expunerii la nicotină – studiu *in vitro***

### **Obiective**

Scopul acestui studiu a fost de a evalua citotoxicitatea nicotinei asupra celulelor stem mezenchimale derivate din parodonțiul uman în ceea ce privește viabilitatea celulară și mecanismele care stau la baza acestui efect, precum și modul în care nicotina influențează diferențierea osteogenică, cunoscut fiind faptul ca nicotina joacă un rol important în reglarea proceselor celulare, cum ar fi proliferarea, diferențierea și migrarea, cu efecte biologice negative asupra acestora.

### **Material și metodă**

S-au utilizat celule stem mezenchimale izolate din țesuturi parodontale umane, așa cum am descris în studiul anterior. Celulele au fost tratate cu 9 diluții seriale de nicotină și incubate timp de 24 h și 48h. Efectele citotoxice ale nicotinei au fost evaluate utilizând testul MTT. Densitatea optică (OD) a fost măsurată la o lungime de undă de 570 nm cu un cititor de microplăci Biotek Synergy 2 (Winooski, VT, USA).

Rezultatele au fost interpretate prin compararea valorilor densității optice (OD) a controalelor netratate cu OD la probele tratate cu nicotină.

S-a efectuat de asemenea evaluarea în microscopia în contrast de faza a celulelor colorate cu MTT, pentru observarea numărului de celule și a morfologiei celulelor. Celulele din culturi au fost vizualizate cu ajutorul unui microscop Zeiss Axiovert fază D1 inversat (Carl Zeiss International GmbH Germania), echipat cu condensor DIC (Differential interference contrast) și obiectiv 20x. Imaginile au fost capturate cu cameră AxioCam MRC.

În ceea ce privește diferențierea după expunerea la nicotină, celulele aparținând celor patru linii celulare (ligament parodontal, ligament circular, țesut gingival și os alveolar) au fost însămânțate pe plăci cu 24 godeuri în mediu de cultură osteogenic, respectând protocolul de diferențiere osteogenica. Timp de 10 zile, celulele au fost tratate zilnic cu câte trei doze diferite de nicotină și colorate la final cu Alizarin red, pentru evidențierea formării depozitelor de calciu, ca un indicator al mineralizării, celulele fiind vizualizate în microscopia optică.

Datele au fost analizate cu one way ANOVA, prin testul de comparație Tukey multiple (valoare  $p < 0,05$ ), utilizând software-ul GraphPad Prism 5 (La Jolla, CA, USA).

### **Rezultate**

Rezultatele testului MTT: dozele mari de nicotină (N1-N3) au indus o moarte celulară semnificativă în toate cele patru linii celulare după 24h și 48h. Cu toate acestea, au existat diferențe în ceea ce privește efectul dozelor intermediare (N4-N7) și joase (N8, N9) de nicotină după cei doi timpi de expunere. În ceea ce privește examinarea în microscopia de contrast de fază, imaginile celulelor colorate cu MTT au confirmat rezultatele testului de viabilitate. Un aspect morfologic caracteristic pentru autofagie a fost observat atunci când s-au utilizat concentrațiile N4-N7, cu prezența autofagozomilor în celule active metabolic. Rezultatele diferențierii după expunerea la nicotină releva faptul că răspunsul de inducere a mineralizării a fost diferit în funcție de originea tisulară a celulelor stem și doza de nicotină administrată. Dozele mici de nicotină, în special N6 și N8 au determinat o mineralizare mai accentuată și apariția nodurilor de osificare.

### **Concluzii**

Nicotina a exercitat efecte citotoxice dependente de doză și de timp pe celulele stem mezenchimale derivate din parodonțiul uman, în funcție de originea lor. Unul dintre mecanismele asociate cu citotoxicitatea nicotinei a fost inducerea activității de autofagie în celulele stem parodontale. Nicotina scade viabilitatea celulelor stem parodontale și alterează potențialul de regenerare al parodonțiului. Nicotina influențează procesul de diferențiere osteogenica în funcție de doza de nicotină administrată și de originea tisulară a celulelor stem implicate.

### **STUDIUL 3 – Evaluarea efectului protector al unor antioxidanți naturali asupra citotoxicității induse de nicotină asupra celulelor stem derivate din zona orală – studiu *in vitro***

#### **Obiective**

În acest studiu s-a dorit evaluarea *in vitro* a efectelor unor substanțe naturale (curcumina și epigallocatechin-3-gallate (EGCG)) cunoscute pentru proprietățile lor efectele lor antiinflamatorii și antioxidante, asupra celor patru tipuri de celule derivate din structuri parodontale, după ce acestea au fost expuse în prealabil la nicotină. Astfel, s-a investigat viabilitatea celulară prin intermediul testelor MTT, Alamar blue și DC-FDA, urmărindu-se confirmarea efectului citotoxic al nicotinei asupra celulelor stem parodontale, precum și dacă tratamentele cu curcumină și EGCG contracarează efectul citotoxic al nicotinei.

#### **Material și metodă**

Celulele aparținând ligamentului circular gingival, ligamentului parodontal, țesutului gingival și osului interradicular au fost însămânțate pe plăci și apoi tratate cu nicotină pentru 24 h și 48h și apoi cu soluțiile de curcumină și EGCG. Efectele citotoxice ale nicotinei au fost evaluate și în studiul anterior, selectând pentru acest experiment doua doze relevante de nicotina. De asemenea, concentrațiile de curcumină și EGCG au fost alese în urma testării lor pe trei linii celulare (ligament parodontal, ligament circular gingival și os alveolar interradicular) într-un studiu realizat în paralel cu acesta. Pentru studiul prezent, citotoxicitatea curcuminei și EGCG-ului asupra celor patru tipuri de celule stem parodontale expuse în prealabil la nicotină a fost evaluată cu ajutorul testelor MTT, Alamar Blue și DC-FDA. Intensitatea colorațiilor a fost analizată cu un cititor de microplăci BioTek Synergy 2. Datele au fost analizate cu software-ul GraphPad Prism 5 (La Jolla, CA, USA). Rezultatele au fost evaluate utilizând programul One Way ANOVA cu ajutorul Testului Tukey de comparații multiple (valoare  $p < 0,05$ ).

#### **Rezultate**

Rezultatele testelor MTT, Alamar blue și DC-FDA relevă faptul că cele patru linii celulare au prezentat răspunsuri diferite la tratamentul cu curcumină și EGCG după expunerea la nicotină, iar efectele au fost dependente de doză și de timp. Testul MTT arată că după 24h, nicotina nu a indus un efect citotoxic semnificativ în cele patru linii celulare, dar după 48h, efectul citotoxic al nicotinei a fost mai intens. Testele MTT și Alamar blue au fost utilizate ca indicatori ai viabilității și activității metabolice a celulelor. Diferențele care au fost observate între cele două teste se datorează faptului că testul Alamar blue detectează, în plus, prezența radicalilor liberi că markeri ai stresului oxidativ în celulele afectate. În schimb, pentru testul DC-FDA, rezultatele au fost uniforme pentru cele patru linii celulare : doza mai mare de nicotină (N1) a avut un efect citotoxic mai intens. În cazul testului și DC-FDA, curcumina a avut un efect protector, iar EGCG ul a stimulat activitatea mitocondrială a celulelor în funcție de țesutul de proveniență. Testul DC-FDA a fost folosit pentru urmărirea formării radicalilor liberi intracelulari.



## **Concluzii**

În studiul prezent, cele trei teste utilizate au confirmat efectul citotoxic al nicotinei asupra celulelor stem parodontale. Dat fiind că au fost folosite doze de nicotină mai puțin citotoxice, nicotina a fost mai bine tolerată, iar celulele și-au păstrat parțial viabilitatea, cu diferența de răspuns între diferitele linii celulare testate. Rezultatele obținute sugerează că stresul oxidativ indus de nicotină a fost direct proporțional cu doza folosită. Tratamentele cu curcumină și EGCG au contracarat, în mare parte, efectul citotoxic al nicotinei, în funcție de doza administrată și de perioada de timp la care celulele au fost expuse la tratament.

## **STUDIUL 4 – Evaluarea corelațiilor dintre dependența de nicotină, nivelurile de monoxid de carbon expirate și starea de igienă orală - studiu observațional**

### **Obiective**

Având în vedere amploarea fumatului în rândul populației, precum și faptul că nicotina și monoxidul de carbon sunt cei mai toxici produși rezultați în urmă fumatului, acest studiu a avut ca scop determinarea corelațiilor dintre dependența de nicotină, nivelurile de monoxid de carbon (CO) expirat și starea de igienă orală, prin compararea acestor caracteristici la fumători (grup de studiu) față de nefumători (grup de control), în vederea dezvoltării viitoare a unui program de monitorizare și prevenție a afecțiunilor orale pentru această categorie de pacienți.

### **Material și metodă**

În studiu au fost cuprinși 65 de participanți, dintre care 50 fumători au fost incluși în lotul de studiu, în timp ce 15 participanți au fost non-fumători și au fost incluși în grupul de control. Dependența de nicotină a fost evaluată prin completarea testului Fagerström modificat. Scorul chestionarului a fost obținut prin însumarea scorurilor de la fiecare răspuns și dependența de nicotină a fost clasificată ca fiind scăzută (scor: 0-3), medie (scor: 4-6) sau mare (scor: 7-10). Starea de igienă orală a fost clasificată în funcție de indicii de igienă orală, de placă, tartru și inflamația gingivală. Pentru a minimiza prejudecățile, doar un singur medic stomatolog a efectuat toate examinările cavității bucale. În final, nivelurile de CO expirate au fost măsurate la toți participanții cu un MicroSmokelyzer (Bedfont Scientific Ltd., Kent, Marea Britanie), un monitor de respirație CO destinat pacienților, cu utilizare multiplă. Datele au fost analizate folosind statistici descriptive. Au fost realizate Grafice box-plot cu calcularea mediilor aritmetice, erorilor standard (SE) și deviațiilor standard (SD). Toate analizele au fost efectuate ajutorul Statistica 7.0 (StatSoft Inc., Oklahoma, Statele Unite ale Americii) și SPSS 15.0 pentru Windows (software-ul IBM, New York, Statele Unite ale Americii), pachete software.

### **Rezultate**

Nivelurile globale de CO măsurate în aerul expirat au fost cuprinse în intervalul 1-20 ppm: 1-2 ppm în grupul de control și de 3-20 ppm, în grupul de studiu. O corelație pozitivă a fost găsită între nivelurile de CO expirate și scorul Fagerström.

A fost observată o diferență semnificativă statistic între fumători și nefumători, în ceea ce privește indicii de placă ( $p = 0,036$ ), de tartru ( $p = 0,001$ ) și indicii gingivali ( $p < 0,001$ ). Indicele gingival s-a dovedit a fi asociat în mod semnificativ cu dependența de nicotină. În plus, s-au observat diferențe semnificative statistic între bărbați și femei în ceea ce privește dependența de nicotină. Per total, indicele de placă a fost asociat în mod semnificativ la nivelurile CO expirat ( $p = 0,008$ ), scorul Fagerström general ( $p = 0,016$ ) și numărul de periaje aledinților pe zi ( $p < 0,001$ ). Indicii de tartru și cel gingival au fost semnificativ asociați cu nivelurile de CO expirat ( $p < 0,001$ ), scor Fagerström general ( $p < 0,001$ ) și numărul de periaje zilnice ale dinților ( $p < 0,001$ ) în populația totală; de asemenea, indicii de tartru și cel gingival au fost asociați în mod semnificativ cu scorul Fagerström în rândul participanților fumători ( $p = 0,029$  și respectiv  $0, p = 0,001$ ). Vârsta nu s-a dovedit a avea un impact semnificativ asupra indicilor de sănătate orală.

### **Concluzii**

Studiul nostru a găsit o corelație pozitivă între indicele de placă, de tartru, indicele gingival și fumat. S-a constatat că dependența de nicotină pare să fie legată de sex, observându-se diferențe semnificative statistic între bărbați și femei. Scorul Fagerström de evaluarea a dependenței de nicotină a fost semnificativ asociat cu numărul de periaje dentare zilnice și indicele gingival. Nivelurile de CO expirate s-au corelat pozitiv cu dependența de nicotină, evaluată prin scorul Fagerström.

## **Concluzii generale**

Primul studiu a demonstrat faptul că celulele izolate din structuri tisulare parodontale îndeplinesc criteriile obligatorii ca să fie încadrate în clasa de celule stem mezenchimale. Celulele studiate pot reprezenta o potențială sursă pentru băncile de celule stem, având avantajul că se pot izola și multiplica relativ ușor și se pot conserva prin înghețare pe perioade îndelungate. Proveniența celulelor stem din diferitele structuri tisulare parodontale este importantă mai ales prin faptul că există diferențe între celulele stem izolate în ceea ce privește expresia genică și fenotipică a markerilor de stemness. Caracteristicile diferite ale celor patru tipuri de celule studiate pot influența comportamentul în funcționalitatea lor (capacitatea de diferențiere, potențialul imunogenic). Aceste observații pot influența decizia folosirii în viitor a acestor celule stem în transplantologie. Nicotina scade viabilitatea celulelor stem parodontale, alterând potențialul de regenerare al parodonțiului. De asemenea, nicotina influențează procesul de diferențiere osteogenica în funcție de doza administrată și de perioada de expunere a celulelor. Nicotina are efect citotoxic asupra celulelor derivate din structuri parodontale și astfel s-ar putea declanșa distrucția parodontale severe ce ar putea afecta rezultatul tratamentelor parodontale. Tratamentele cu curcumină și EGCG au contracarat, în mare parte, efectul citotoxic al nicotinei, rezultatele studiului de față furnizând dovezi semnificative care să sprijine punerea în aplicare a abordărilor terapeutice individualizate pentru o gestionare mai eficientă a bolilor parodontale legate de fumat. În final, având în vedere faptul că nicotina și monoxidul de carbon sunt cei mai toxici produși rezultați în urma fumatului,

s-au evaluat gradul de dependența nicotinică, nivelul de monoxid de carbon din aerul exhalat și statusul de igienă orală și s-au găsit corelații pozitive între dependența de nicotină și indicii de placa, de tartru și gingivali, ceea ce relevă încă o influență negativă a fumatului asupra structurilor tisulare orale.

## **Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei**

Teza de doctorat prezintă o sinteză a efectelor nocive ale fumatului asupra structurilor tisulare parodontale, precum și descoperirea unor noi metode terapeutice la acest nivel.

Toate cele patru studii efectuate sunt de mare actualitate și complexitate, iar originalitatea lor este recunoscută prin diseminarea rezultatelor cercetărilor în publicații de specialitate.

Astfel, s-a demonstrat în primul studiu faptul că se pot obține celule stem din structuri tisulare de la nivelul cavității orale și au fost studiate în paralel patru astfel de tipuri celulare, demonstrându-se calitatea lor de celule stem mezenchimale.

Amploarea pe care fumatul o are în momentul de față la nivel mondial a făcut să testăm citotoxicitatea nicotinei pe cele patru tipuri de celule stem parodontale, evaluând efectele rezultate. Este primul studiu efectuat în paralel pe patru tipuri celulare parodontale.

Prevalența bolii parodontale, cât și efectele nocive demonstrate ale fumatului la acest nivel au dus cercetarea mai departe, căutând metode terapeutice moderne de refacere a structurilor parodontale afectate de fumat, iar testarea unor compuși polifenolici naturali cum sunt curcumina și EGCG-ul constituie, de asemenea, un element de originalitate, evaluând comparativ efectele asupra leziunilor parodontiului.

Nu s-a găsit în literatură nici un studiu care să stabilească corelații între dependența nicotinică, nivelul de monoxid de carbon și statusul igienei orale, astfel că studiul al patrulea reprezintă un punct de pornire pentru cercetări viitoare mai amănunțite și mai ample.

Rezultatele obținute oferă noi perspective în monitorizarea și profilaxia bolii parodontale la pacienții fumători și în aplicarea de noi modalități terapeutice eficiente. Având în vedere prevalența crescută a fumatului și a bolii parodontale în rândul populației, este necesară prevenția primară oferită în cabinetul medicului dentist, precum și crearea și promovarea unor programe antifumat în rândul populației de toate vârstele.

---

PhD THESIS SUMMARY

# The Effect of Smoking on Oral Health

---

PhD: **Minodora Voinea**

---

Scientific coordinator: **Prof. Dr. Radu Septimiu Câmpian**

---



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

# TABLE OF CONTENTS

<b>INTRODUCTION</b>	1
<b>BACKGROUND</b>	
<b>1. Smoking - a clinical condition</b>	5
1.1. General information on smoking	5
1.2. Nicotine	5
1.2.1. Properties, metabolism and biomarkers	5
1.2.2. Nicotine addiction	6
1.2.3. Smokers assessment	6
1.2.3.1. Clinical diagnosis of nicotine dependence	6
1.2.3.2. Laboratory diagnosis of nicotine dependence	7
1.3. Effects of smoking on general health	8
1.4. Effects of smoking on oral health	9
1.4.1. Effects of smoking on periodontal tissues	9
1.4.2. Effects of smoking on dental tissues	10
1.4.3. Smoking as a risk factor for oral and maxillofacial oncological diseases	10
<b>2. Perspectives on tissue regeneration from mesenchymal stem cells derived from dental tissues</b>	11
2.1. Tissue engineering principles	11
2.1.1. Basic principles	11
2.1.1.1. What does regenerative medicine mean?	11
2.1.1.2. The purpose of regenerative medicine	11
2.1.1.3. How does regenerative medicine work?	11
2.1.2. Types of cellular therapies	12
2.1.2.1. Cell implantation therapy	12
2.1.2.2. Cell induction therapy	12
2.1.2.3. Matrix support	13
2.1.3. Regenerative therapies in medicine	13
2.2. Stem cells	14
2.2.1. Basic principles	14
2.2.1.1. Definition	14
2.2.1.2. Characteristics	14
2.2.1.3. Stem cells classification	14
2.2.1.4. Sources of stem cells	16
2.2.2. Cellular therapies applied in dental medicine	16
2.2.2.1. Dentine-dental pulp complex regeneration	17

2.2.2.2.Dental bioengineering	17
2.2.2.3 Skin, oral mucosa, facial muscles and salivary glands regenerative therapies	18
2.2.2.4. Regenerative therapies on temporomandibular joint and bones.	19
2.2.2.5.Periodontum regenerative therapy	19
2.2.3 Dental tissue derived stem cells in periodontium regeneration	21
<b>3. Natural polyphenolic antioxidants in regenerative therapy</b>	23
3.1. Natural polyphenols in epigenetics	23
3.2. Natural polyphenols in regenerative therapy	23
3.2.1. Curcumin3	23
3.2.2. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG)	25
<b>PERSONAL CONTRIBUTION</b>	
<b>1. OBJECTIVES/ PURPOSE OF THESIS</b>	31
<b>2. 1<sup>st</sup> STUDY – Isolation and characterization of human MSCs derived from periodontal tissues – an <i>in vitro</i> study</b>	33
2.1. Introduction	33
2.2. Objectives	35
2.3. Materials and methods	35
2.4. Results	42
2.5. Discussions	50
2.6. Conclusions	54
<b>3. 2<sup>nd</sup> STUDY: Human Periodontium derived mesenchymal stem cells viability and differentiation potential evaluation after nicotine exposure- an <i>in vitro</i> study</b>	55
3.1. Introduction	55
3.2. Objectives	55
3.3. Materials and methods	56
3.4. Results	60
3.5. Discussions	68
3.6. Conclusions	72
<b>4. 3<sup>rd</sup> STUDY- Evaluation of the protective effects of natural antioxidants on nicotine induced cytotoxicity of oral derived stem cells – an <i>in vitro</i> study</b>	73
4.1. Introduction	73
4.2. Objectives	74
4.3. Materials and methods	75
4.4. Results	78
4.5. Discussions	82
4.6.Conclusions	87

<b>5. 4<sup>th</sup> STUDY: assessment of the correlations between nicotine dependence, exhaled carbon monoxide levels and oral hygiene status- an observational study</b>	89
5.1. Introduction	89
5.2. Objectives	90
5.3. Materials and methods	90
5.4. Results	93
5.5. Discussions	99
5.6. Conclusions	100
<b>6. General conclusions</b>	101
<b>7. Originality</b>	103
<b>REFERENCES</b>	105
<b>ADDENDUM</b>	121

**Key words:** smoking, mesenchymal stem cells, periodontal tissue, polyphenols, cytotoxicity, oral hygiene, carbon monoxide, nicotine addiction

## **Introduction**

Tobacco use is a global health problem. Its negative effects on almost every organ have been well documented. Smoking affects oral health especially by causing periodontal disease.

Periodontal disease is also regarded as a major health issue consisting of a complex etiopathogenesis. Smoking represents one of the main risk factors by affecting the development and severity of periodontal lesions. The association between smoking and the risk for developing periodontal disease has been well studied, however, the mechanisms of tissue damage connected to smoking are not clearly explained.

Prior studies proved that nicotine, one of the most important tobacco toxic constituents, affects cellular proliferation, induces oxidative stress and activates inflammation mediators which linked to bone resorption.

Considering the alarming smoking statistics and the high prevalence of periodontal disease, the purpose of this thesis was to assess the effects of nicotine on periodontal tissues and how natural polyphenolic compounds with antioxidant and anti-inflammatory action affect tissular response.

### **1<sup>st</sup> STUDY: Isolation and characterization of human MSCs derived from periodontal tissues – an *in vitro* study**

#### **Objectives:**

It is well known that periodontal tissues represent an accessible source of mesenchymal stem cells. The aim of the study was to harvest mesenchymal stem cells from 4 human periodontal tissues: periodontal and circular ligaments, interradicular bone and gingival tissue and to prove their stemness state.

#### **Material and methods**

Following periodontal tissue harvesting, fragments were placed in a 50 ml Falcon tube in 15 mL complete medium containing 10% fetal serum and transferred to the laboratory. The fragments were kept at 4°C until processing (maximum 24 hours).

Mechanical processing was used, the fragments were grinded using sterile instruments, filtered, and centrifuged. They were suspended and cultured afterwards in Cole flasks, following the protocols. The isolated stem cells from the periodontal tissues were characterized through immunocytochemical staining, flow cytometry and gene expression evaluation, analyzing their osteogenic, chondrogenic, neural differentiation potential and their mesenchymal stem cell status.

Immunocytochemical staining with specific monoclonal antibodies was used for phenotypical characterization. Immunocytochemical coloring highlights stem cell markers either on the surface, or inside the cultured cell.

Flow cytometry was also used to investigate the expression of stem cells markers. Cell analysis was done with BD FACS Canto II, 6-color flow cytometer, with BD FACSDiva™ software (version 6.1.3).

In order to evaluate stemness gene expression real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) assay was performed. Cells were cultured in TriZol and processed for the total RNA isolation (using the classic method with phenol-chloroform). ARN was evaluated quantitatively with the NanoDrop ND-1000 spectrophotometer and qualitatively with the Agilent 2100 Bioanalyzer system.

Differentiation into three different cell lines was assessed in order to prove stemness state. All the 4 cell types were cultured in complete medium to induce osteogenic differentiation, following the protocol. Neural differentiation protocol consisted of 2 separate steps: the first one using a medium containing two growth factors and neural differentiation supplements, while in the second one, nicotinamide, IBMX and Nerve Growth Factor were added to the initial medium, in order to ensure a better cell viability. The protocol for chondrogenic differentiation used TGFβ3 as the main medium component. Differentiation was assessed by immunocytochemical staining and Alcian blue coloring.

## **Results**

Immunocytochemical staining with monoclonal antibodies in the 4 types of studied cells showed positivity for markers which are specific to mesenchymal stem cells: ALP, CD44, CD49, CD73. The tested stem cells did not express CD45. Other markers of stemness showed differences in the positive expression intensity. Moreover, similar results were obtained in flow cytometry. RT-PCR showed that BDNF, Nanog and Oct 3/4 were expressed in all 4 types of cell lines.

Studied cells were cultured in osteogenic, chondrogenic and neural differentiation mediums, in order to evaluate their differentiation potential. The potential to differentiate into other three cell lines has been shown for all the studied cells.

## **Conclusions**

The study proved the stemness state of oral tissue isolated cells, which by meeting all the criteria, may be considered as mesenchymal stem cells. Thus, these cells have the capacity to be isolated and to easily multiply *in vitro*, to be preserved for a long amount of time by freezing and could represent an important source for stem



cell banks. The stem cell origin induced not only an expression heterogeneity of the markers of stemness, but also different positivity percentages for the markers, therefore contributing to the decision regarding the future use of these stem cells in transplantology.

## **2<sup>nd</sup> STUDY: Human Periodontium derived mesenchymal stem cells viability and differentiation potential evaluation after nicotine exposure- an *in vitro* study**

### **Objectives**

The purpose of this study was to assess the nicotine cytotoxicity on periodontium derived mesenchymal stem cells regarding cell viability and the mechanisms underlying this effect, as well as the way in which nicotine affects the osteogenic differentiation, knowing that nicotine induces negative effects on cellular processes such as proliferation, differentiation and migration.

### **Materials and methods**

Mesenchymal stem cells were isolated from human periodontal tissues as described in the previous study. Cells were treated with 9 successive nicotine dilutions and incubated for 24 h and 48 h. The cytotoxic effects of nicotine were assessed using the MTT assay. The optical density (OD) was measured at a wavelength of 570 nm with a Biotek Synergy 2 microplate reader (Winooski, VT, USA). The results were interpreted by comparing the OD values of untreated controls with nicotine treated samples.

In order to determine the number and morphology of cells, histological analysis was also performed. Cells in cultures were visualized using a Zeiss Axiovert D1 inverted phase microscope (Carl Zeiss International, GmbH, Germany), equipped with a PlasDIC condenser and a 20X objective. Images were captured with an AxioCam MRC camera.

Following nicotine exposure, all four types of cells (GLSCs, PDLSCs, GTSCs and ABSCs) were cultured in osteogenic medium, following the osteogenic differentiation protocol, in order to determine the differentiation potential. Each day, for ten days, they were treated with three different nicotine doses and colored in the end with Alizarin red to highlight calcium deposits, representing markers for mineralization. Cells were visualized with optical microscopy.

Data were analyzed with the one-way ANOVA, followed by Tukey's Multiple Comparison Test ( $p$ -value  $<0.05$ ), using the GraphPad Prism 5 software (La Jolla, CA, USA).

### **Results**

High nicotine doses (N1-N3) induced a significant cell death in all four cell lines after 24h and 48h. However, there were differences in the effect of intermediate (N4-N7) and low doses (N8, N9) of nicotine at the two-time points. Phase contrast microscopy images of MTT colored cells confirmed the viability test results. A characteristic aspect of autophagy has been found when using N4-N7 concentrations, with the presence of autophagosomes in metabolic active cells. Regarding cell

differentiation after nicotine exposure, mineralization induction varied according to nicotine doses and stem cell origin. Lower doses of nicotine, especially N6 and N8 lead to a higher mineralization and to calcification nodules.

### **Conclusions**

Nicotine exerted dose- and time-dependent cytotoxic effects on mesenchymal stem cells derived from the human periodontium. The periodontal stem cells exhibited different responses to nicotine according to their origin. One of the mechanisms associated with nicotine cytotoxicity was the induction of autophagic activity in the periodontal stem cells. Nicotine decreases viability of periodontal stem cells and alters the regenerative potential of the periodontium. Moreover, it affects the osteogenic differentiation process according to the administered nicotine dose and to the stem cell origin.

## **3<sup>rd</sup> STUDY- Evaluation of the protective effects of natural antioxidants on nicotine induced cytotoxicity of oral derived stem cells – an *in vitro* study**

### **Objectives**

This study aimed to investigate *in vitro* the effects of certain natural products (Curcumin and Epigallocatechine-3-gallate (EGCG)), which are well known for their anti-inflammatory and antioxidant properties, on the four types of periodontal derived stem cells. Cells were previously exposed to nicotine. Thus, cell viability was assessed using MTT, Alamar blue and DC-FDA tests. The cytotoxic effect of nicotine on periodontal stem cells, as well as the capacity of Curcumin and EGCG treatments to counteract the cytotoxic effect of nicotine.

### **Materials and methods**

Stem cells from the gingival ligament (GLSCs),gingival tissue, periodontal ligament (PDLSCs) and the inter-radicular alveolar bone (ABSCs) were isolated using the explant technique, cultured on 96-well plates and treated firstly with nicotine for 24 h and 48 h, followed by Curcumine and EGCG treatment.

Cytotoxic effects of nicotine have been evaluated in the previous study. Two relevant doses of nicotine were chosen for this study. Moreover, Curcumin and EGCG concentrations were chosen based on the results of a concomitant study which tested different concentrations on three different cell lines (gingival ligament, periodontal ligament, inter-radicular alveolar bone).

In the present study, MTT, Alamar Blue and DC-FDA tests were used to evaluate the cytotoxicity of curcumine and EGCG on the four types of periodontal stem cells previously exposed to nicotine.

The optical density (OD) was measured with a microplate reader Biotek Synergy 2. Data were analyzed with GraphPad Prism 5 software (La Jolla, CA, USA). The results were evaluated by the one-way ANOVA, followed by Tukey's Multiple Comparison Test (p value <0.05).

### **Results**

MTT, Alamar blue and DC-FDA tests demonstrate that the four types of stem cells, previously treated with nicotine, showed selective responses when exposed to Curcumin and EGCG and that the effects were dose- and time-dependent.

MTT test showed that there was no significant cytotoxic effect on the four cell types after 24 h of nicotine exposure, however after 48 h, there was a more intense cytotoxic effect of nicotine.

MTT and Alamar tests were indicators of cell viability and metabolic activity. Alamar blue test can additionally detect free radicals as markers of oxidative stress in the affected cells, thus explaining the differences between the two tests. On the other hand, there were **similar** results in the DC-FDA test for the four cell types: the higher dose of nicotine (N1) induced a more intense cytotoxic effect. DC-FDA test showed a protective effect of curcumine, while EGCG induced the mitochondrial activity of cells according to their origin. DC-FDA test was used in order to assess intracellular free radical formation.

### **Conclusions**

In the present study all the three tests confirmed the cytotoxic effect of nicotine on periodontal stem cells. Lower doses of nicotine were used, inducing a lower cytotoxic effect, therefore nicotine was better tolerated and cell viability was partially preserved. Different cell types showed selective responses. Results suggest that the oxidative stress induced by nicotine was dose-dependent. According to the used dose and length of exposure, curcumin and EGCG treatments counteracted the cytotoxic effect of nicotine.

## **4<sup>th</sup> STUDY: assessment of the correlations between nicotine dependence, exhaled carbon monoxide levels and oral hygiene status- an observational study**

### **Objectives**

Considering the high prevalence of smoking and the toxicity of nicotine and carbon monoxide, products released from smoking, this study aimed to determine the correlations between nicotine dependence, exhaled carbon monoxide (CO) levels and oral hygiene status by comparing these features in smokers (study group) against a control group of non-smokers (control group) and to help develop an oral disease screening and prevention program.

### **Materials and methods**

*Sixty five participants (50 smokers in the study group and 15 non-smokers in the control group) were enrolled in the study.* Nicotine dependence was assessed by filling in the modified Fagerström test. The score of the questionnaire was obtained by adding up the scores from each answer. Based on the obtained score, nicotine dependence was classified as low (score: 0-3), medium (score: 4-6) or high (score: 7-10). Oral hygiene status was classified according to the oral hygiene indices of plaque, calculus and gingival inflammation. o minimize bias, only one dentist performed all oral cavity examinations. Finally, the exhaled CO levels were measured in all participants with a

MicroSmokelyzer (Bedfont Scientific Ltd., Kent, United Kingdom), a breath CO monitor intended for multipatient use.

The data were analyzed using descriptive statistics. Box-plot graphs with arithmetic means, standard errors (SE) and standard deviations (SD) were calculated. All statistical analyses were performed using Statistica 7.0 (StatSoft Inc., Oklahoma, USA) and SPSS 15.0 for Windows (IBM Software, New York, USA) software packages.

### **Results**

The overall measured exhaled CO levels were in the 1–20 ppm range: 1–2 ppm in the control group and 3–20 ppm in the study group. A positive correlation was found between the exhaled levels of CO and the Fagerström score. *A statistically significant difference was observed between the 2 groups in terms of plaque, ( $p=0.036$ ), calculus ( $p=0.001$ ) and gingival indices ( $p<0.001$ ).* The gingival index was found to be significantly associated to nicotine dependence. Additionally, statistically significant differences were observed between men and women in terms of nicotine dependence. Overall, the plaque index was significantly associated with the exhaled CO levels ( $p=0.008$ ), general Fagerström score ( $p=0.016$ ) and the number of daily teeth brushings ( $p<0.001$ ). The calculus and gingival indices were significantly associated with the exhaled CO levels ( $p<0.001$ ), general Fagerström score ( $p<0.001$ ) and the number of teeth brushings daily ( $p<0.001$ ) in the overall population; also, the calculus and gingival indices were significantly associated with the Fagerström score in smoker participants ( $p=0.029$  and  $p=0.001$ , respectively). Age was not found to have a significant impact on the oral health indices.

### **Conclusions**

Our study found a positive correlation between the plaque, calculus and gingival indices and smoking. Statistically significant differences were observed between men and women in terms of nicotine dependence. Moreover, the Fagerström score assessing nicotine dependence was significantly associated with the number of daily tooth brushings and the gingival index. A positive correlation between exhaled CO levels and nicotine dependence was shown.

### **General conclusions**

The first study proved that cells isolated from periodontal tissues meet all the criteria in order to be classified as mesenchymal stem cells. These cells could represent an important source for stem cell banks, having the capacity to be isolated and to easily multiply *in vitro*, to be preserved for a long amount of time. Isolated stem cells presented selective stemness marker expressions according to their origin. The four types of cells present various characteristics, thus determining their functional response (the differentiation and immunogenic potential). These findings could contribute to the future use of stem cells in transplantology. Nicotine has a negative effect on periodontal stem cell viability, affecting the periodontium's regeneration potential. Furthermore, it has a dose- and time-dependent effect on the osteogenic differentiation process. Nicotine induces a cytotoxic activity on periodontal derived stem cells therefore, causing severe tissue damage and influencing periodontal treatments.

Curcumin and EGCG treatments counteracted the cytotoxic effect of nicotine. The present study proves the benefit of individualized treatments for a better management of smoked related periodontal disease.

Finally, considering the high toxicity of nicotine and carbon monoxide caused by smoking, the degree of nicotine dependence, exhaled carbon monoxide levels and oral hygiene status have been evaluated, showing positive correlations between nicotine dependence and indices of plaque, calculus and gingival inflammation and therefore proving a negative influence of smoking on oral tissues.

## **Originality**

The Phd thesis presents a summary of the negative effects of smoking on periodontal derived tissues and discovers new therapeutic methods .

All the four studies are of great relevance and complexity, various speciality journals having published the obtained results, therefore confirming their originality.

The first study showed that stem cells can be isolated from oral derived tissues, evaluating four types of cells. Moreover, it proved their stemness state.

The high prevalence of worldwide smoking determined us to evaluate the cytotoxic effect of nicotine on the four types of periodontal stem cells. This is the first study involving four types of periodontal cell types at the same time.

The prevalence of periodontal disease, as well as the negative effects of smoking lead to a further search of new therapeutic methods of restoring the damaged periodontal structures. Moreover, another original project is represented by natural polyphenolic compounds such as curcumin and EGCG comparative testing.

To our best knowledge, this is the first conducted study to assess correlations between nicotine dependence, exhaled carbon monoxide levels and oral hygiene status. The fourth study represents a starting point for more complex and detailed future research.

Based on the obtained results, new efficient methods of screening and prevention for periodontal disease in smokers can be developed in the future. Considering the high prevalence of worldwide smoking and of periodontal disease it is important that primary prevention programs/ education should be offered by each dentist, as well as promoting anti-smoking campaigns among population.