
TEZĂ DE DOCTORAT

Studii asupra efectului terapiei adjuvante în parodontite

Doctorand **Irina Lupșe**

Conducător de doctorat Prof.dr. **Alexandra Roman**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	13
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	
1. Microbiomul oral	19
1.1. Istoric și generalități	19
1.2. Relația dintre microbiomul oral și diferite afecțiuni sistemice	20
1.3. Parodontita – boală infecțioasă	22
2. Patogeni parodontali – organisme “cheie”	25
2.1. Consecințe ale vieții în comunitatea polimicrobiană subgingivală	25
2.2. Bacteriile parodontopatogene în comunitate – multiple roluri, un singur microorganism	26
2.3. <i>Porphyromonas gingivalis</i> – un patogen parodontal cheie	29
3. Terapia non-chirurgicală a parodontitelor	33
3.1. Justificarea utilizării terapiei adjuvante	33
3.2. Efectul adjuvant al clorhexidinei	34
3.3. Efectul adjuvant al povidonei iodate	36
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	
1. Ipoteza de lucru/obiective	39
2. Metodologie generală	41
3. Studiul 1 – Efectul citotoxic asupra celulelor mezenchimale stromale gingivale indus de unele produse comerciale locale antimicrobiene folosite în terapia parodontală	45
3.1. Introducere	45
3.2. Ipoteza de lucru	50
3.3. Material și metodă	50
3.4. Rezultate	54
3.5. Discuții	58
3.6. Concluzii	64
4. Studiul 2 – Efectul unor substanțe locale antimicrobiene asupra suprafețelor radiculare	67
4.1. Introducere	67
4.2. Ipoteza de lucru	71
4.3. Material și metodă	71
4.4. Rezultate	76
4.5. Discuții	82
4.6. Concluzii	86
5. Studiul 3 – Matrix – Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) pentru screening-ul bacteriomului subgingival la un grup de pacienți tratați pentru parodontită	89
5.1. Introducere	89
5.2. Ipoteza de lucru	91
5.3. Material și metodă	91
5.4. Rezultate	95
5.5. Discuții	100

5.6. Concluzii	102
6. Concluzii generale	103
7. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	107
REFERINȚE	109

Cuvinte cheie: Parodontita, Microbiom oral, Terapie adjuvantă, Culturi celulare

INTRODUCERE

Cu toată evoluția în domeniu legată de tratament și protocoale ferme de screening, parodontita rămâne o mare problemă de sănătate publică datorită prevalenței mari în rândul populației. Peste jumătate din persoane prezintă parodontită, ceea ce induce probleme majore legate de sănătatea orală, afectează calitatea vieții indivizilor, impactează starea de sănătate sistemică și nu în ultimul rând reprezintă o încărcătură economică importantă a sistemului de sănătate.

Derularea cercetărilor doctorale a plecat de la faptul că literatura de specialitate raportează informații inconsistente asupra utilizării produselor antimicrobiene pentru aplicații locale adjuvante în terapia parodontitelor și nu poate face recomandări ferme cu privire la folosirea preferențială a anumitor produse.

Deși informații recente au asociat produsele antibiotice locale adjuvante terapiei standard de instrumentare mecanică subgingivală cu modificări pozitive semnificative statistic în termeni de reducere a adâncimilor la sondare și câștig de atașament comparativ cu instrumentarea mecanică subgingivală, relevanța clinică a beneficiilor este discutabilă. Mai mult decât atât, problemele legate de posibila citotoxicitate asociată acestor produse nu a fost elucidată. În acest context, elementele de originalitate ale cercetărilor doctorale derivă din studierea complexă a trei produse comerciale antimicrobiene adjuvante mai puțin investigate, fiind derulate studii *in vitro* și clinice.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Această secțiune tratează, pe parcursul a trei capitole, o serie de aspecte cu privire la microbiomul oral, patogenii parodontali cheie și diferite preparate adjuvante antimicrobiene.

Studiul bibliografic s-a concentrat asupra datelor epidemiologice recente ale microbiomului oral și realității acestuia cu diferite afecțiuni sistemice. De asemenea această parte a tezei furnizează date referitoare la importanța patogenilor parodontali, consecințe ale vieții în comunitate și efectul pe care îl are terapia adjuvantă în tratamentul non-chirurgical parodontal.

Parodontita este recunoscută ca o boală cronică, multifactorială, de natură inflamatorie și etiologie infecțioasă. În producerea acestei afecțiuni sunt implicate bacterii subgingivale formând un consorțiu înalt organizat, care are o virulență înaltă în comparație cu microorganismele componente individuale. Idei recente susțin disbioza microorganismelor subgingivale ca având rol etiologic și de progresia a parodontitei. Tratamentul actual țintește în primul rând reducerea încărcăturii bacteriene subgingivale și reechilibrarea disbiozei locale. De multe ori parodontita este tratată folosind o abordare combinată mecanică și anti-infecțioasă.

Analiza asupra studiilor recente, disponibile în literatura de specialitate constituie cadrul teoretic în baza căruia s-au inițiat cele trei cercetări personale derulate pe parcursul studiilor doctorale.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Pentru derularea în condițiile legii ale cercetărilor doctorale s-au elaborat protocoale specifice de lucru pentru fiecare dintre studiile realizate, conform normelor etice naționale și europene. Au fost obținute aprobările din partea Comisiei de Etică a Universității de Medicină și Farmacie "Iuliu Hațieganu", Cluj-Napoca (80/1.02.2018) și a Comisiei de Etică a Spitalului Clinic Județean de Urgență, Cluj-Napoca(10539/B/4.05.2018).

În derularea cercetărilor doctorale s-a ținut cont de recomandările Declarației de la Helsinki cu privire la cercetările pe subiecți umani. Înainte de includerea în studii, fiecare pacient a fost informat despre modalitatea de derulare a studiilor și apoi a semnat consimțământul informat. Acordul informat s-a obținut atât pentru pacienții incluși în studiile clinice cât și pentru pacienții de la care s-au recoltat țesuturi pentru studiile *in vitro*.

Rezultatele derivate din contribuțiile personale au fost publicate în trei articole: două articole în jurnale de specialitate ISI cu factor de impact: Materials(Basel) și Revista Română de Medicină de Laborator – 2021,2022) și un articol într-o revistă CNCSIS B+ (Revista Română de Stomatologie – 2018).

STUDIU 1. "Efectul citotoxic asupra celulelor mezenchimale stromale gingivale indus de unele produse comerciale locale antimicrobiene folosite în terapia parodontitelor"

Introducere. Țesuturile parodontale conțin celule mezenchimale stromale capabile să restabilească structura și funcția, însă capacitatea de regenerare intrinsecă a parodontiului este limitată. Celulele mezenchimale stromale parodontale comunică cu structurile învecinate și cu celulele adiacente, producând răspunsuri favorabile din punct de vedere al regenerării tisulare. Cu toate acestea, chiar și schimbările cele mai mici ale micromediului local afectează comportamentul celulelor mezenchimale stromale și potențialul lor regenerativ. Astfel, protecția celulelor locale împotriva efectelor nocive ale unor terapii parodontale aplicate local pare a fi o țintă rațională în tratarea parodontitei. Deși eficiente din punct de vedere al efectului antimicrobian, substanțele aplicate subgingival pot exercita o serie de efecte toxice locale. Unele

produse comerciale pe bază de clorhexidină, hiclat de doxiciclină sau gel de minociclină, gel de metronidazol, hipoclorit de sodiu, povidonă iodată, nanosfere de argint sau acizi sulfonici sunt în prezent disponibile comercial, fiind utilizate în practica clinică, ca terapii locale adjuvante instrumentării subgingivale, în principal datorită efectului lor antimicrobian.

Obiectiv. Studiul și-a propus să investigheze efectul unui produs comercial pe bază de acizi sulfonici/sulfurici asupra proliferării și viabilității celulelor mezenchimale stromale izolate din țesuturile gingivale în comparație cu efectele induse de două produse comerciale mai puțin studiate, unul pe bază de hipoclorit de sodiu și altul pe bază de nanoparticule de argint. În scopul acestui studiu, a fost testată următoarea ipoteză nulă: biocompatibilitatea produselor comerciale testate nu a variat cu schimbarea concentrațiilor de produs.

Material și metodă. Acest studiu a utilizat celule mezenchimale stromale gingivale prelevate, cultivate și caracterizate complet de echipa de cercetare. S-au utilizat trei produse antimicrobiene adjuvante disponibile în comerț, deja utilizate pentru instrumentare mecanică subgingivală: HybenX (Epien Medical, St. Paul, MN, SUA), Perisolv (RLS Global, Göteborg, Suedia), Perioflush (Dental Life Sciences, Wigan, Marea Britanie). Pentru acest scop, au fost preparate medii de cultură experimentale prin suplimentarea mediului de cultură standard cu diferite concentrații ale celor trei produse comerciale. Celulele mezenchimale stromale gingivale au fost cultivate în mediile de cultură experimentale. Capacitatea de proliferare a celulelor mezenchimale stromale gingivale a fost testată folosind metoda Cell Counting Kit-8 (CCK8), după 3 și 5 zile de cultivare în medii de creștere experimentale. De asemenea, după 24 de ore de cultivare a celulelor mezenchimale stromale gingivale în mediile experimentale, s-a efectuat testul MTT (bromură de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium) pentru a evalua supraviețuirea celulară ca expresie a citotoxicității induse de substanțele antimicrobiene. Pentru grupul de control, au fost utilizate celule mezenchimale stromale gingivale cultivate în mediul de cultură standard. Toate experimentele au fost efectuate în triplicat.

Rezultate. După 48 ore, valorile densității optice indicând proliferarea celulară după expunerea la diferite concentrații de HybenX nu au diferit statistic semnificativ. După 5 zile de cultivare, concentrația de 50% Hybenx a inhibat semnificativ proliferarea celulară în comparație cu concentrațiile de 5% Hybenx ($p = 0.001$), 2% Hybenx ($p = 0.003$) și cu mediul control ($p = 0.001$). În ceea ce privește expunerea la preparatul Perioflush, densitățile optice după 48 ore au indicat valori de proliferare semnificativ mai reduse pentru celulele cultivate în mediile experimentale conținând 50% și respectiv 20% Perioflush în comparație cu celulele cultivate în mediul control ($p = 0.002$ și respectiv $p = 0.014$). Diferențe semnificative statistic ale valorilor proliferării celulare s-au identificat pentru momentul 5 zile între 10% Perisolv vs. 10% Perioflush ($p = 0.058$). Pentru cea mai mică concentrație, s-au calculat diferențe semnificative între valorile densității optice la 48 ore între 2% Hybenx vs. 2% Perioflush ($p = 0.045$) și 2% Perisolv vs. 2% Perioflush ($p = 0.036$), iar la momentul 5 zile diferențele semnificative statistic au fost între 2% Perisolv vs. 2% Perioflush ($p = 0.036$).

Concluzii. Cele trei produse comerciale utilizate ca substanțe adjuvante antimicrobiene la instrumentarea mecanică subgingivală, au indus o citotoxicitate dependentă de doză în ceea ce privește reducerea proliferării celulelor mezenchimale stromale gingivale. De asemenea produsul pe bază de nanoparticule de argint la concentrații în mediu de

cultură de 50%, 20% și 10% a inhibat statistic semnificativ viabilitatea celulelor mezenchimale stromale gingivale în comparație cu mediul control standard.

Studiu 2. “Efectul unor substanțe locale antimicrobiene asupra suprafețelor radiculare”

Introducere. Dincolo de controlul infecției, rezultatul ideal al tratamentului parodontal este obținerea regenerării parodontale. Cu toate acestea regenerarea parodontală în urma vindecării post-terapeutice este impredictibilă, chiar și în condițiile unui abord intervențional chirurgical suplimentar când se obține în cel mai bun caz doar o regenerare parțială. Spre deosebire de tiparul de vindecare reparatorie, regenerarea parodontală înseamnă formarea *de novo* a structurilor parodontale pierdute, prin mimarea mecanismelor embrionare implicate în dezvoltarea parodontiului. În acest context, au fost propuse mai multe tratamente adjuvante pentru a obține o suprafață radiculară decontaminată. Utilizarea agenților chimici se propune în scopul biomodificării suprafețelor radiculare și a stimulării vindecării. Acțiunea agenților chimici facilitează detașarea depozitelor de tartru, dizolvarea detritusului dentinar remanent, decalcifierea suprafețelor radiculare planate și expunerea fibrelor de colagen de la nivel dentinar sau cemental.

Obiectiv. Studiul de față și-a propus să aprecieze efectele unui preparat desicant pe bază de acizi sulfonici/acid sulfuric asupra structurilor radiculare și asupra aderenței celulelor mezenchimale stromale de origine gingivală-prerechizită pentru inducerea unor fenomene reparative/ regenerative optime. Efectele produsului desicant s-au evaluat comparativ cu alte două produse comerciale adjuvante locale, unul pe bază de hipoclorit de sodiu și altul pe bază de nanoparticule de argint.

Material și metodă. Studiul prezent a utilizat aceleași celule mezenchimale stromale gingivale ca și la studiul 1, respectiv celule care au fost folosite de echipa de cercetare și în alte studii.

În scopul acestui studiu, rădăcinile dinților extrași au fost detartrate manual. De la nivelul rădăcinilor detartrate s-au obținut probe radiculare de dimensiuni standard, care au fost împărțite în patru grupe: un grup control și câte o grupă tratată cu câte unul dintre cele trei produse comerciale. Apoi, celulele mezenchimale stromale gingivale s-au cultivat cu probele radiculare. Studiul a folosit observația SEM pentru a evalua modificările probelor radiculare induse de detartrajul asociat cu fiecare dintre produsele comerciale și pentru a determina aderența celulelor mezenchimale stromale gingivale la probele tratate. Toate experimentele au fost efectuate în triplicat.

Rezultate. Observațiile SEM au evaluat modificările probelor radiculare după realizarea instrumentării manuale cu chiureta Gracey asociată cu unul dintre produsele comerciale locale adjuvante precum și adeziunea celulelor mezenchimale stromale gingivale la probele tratate. S-a observat că, în general, probele tratate prin instrumentare manuală sunt acoperite de un strat de detritus continuu care conferă suprafeței un aspect general neted.

La magnificații mai mari, suprafața radiculară instrumentată manual are un aspect mai rugos indus de stratul de detritus. Aspectul general al suprafețelor probelor instrumentate cu chiureta observate la magnificație mică este relativ omogen cu foarte rare striuri induse

de chiuretă. Nu s-au observat pierderi însemnate de structuri dure, șanțuri de instrumentare sau aspecte denivelate ale suprafețelor instrumentate cu chiureta.

Concluzii. După detartrajul manual cu chiurete Gracey, probele radiculare au fost acoperite cu un strat de detritus remanent compact rezultând suprafețe relativ netede și omogene. Produsele Hybenx și Perisolv au indus suprafețe radiculare mai uniforme și mai stabile datorită unei îndepărtări mai eficiente a detritusului remanent. Probele tratate cu instrumentare manuală și Perioflush au prezentat un depozit abundent de detritus care conferă un aspect rugos al suprafețelor. Deschiderea tubulilor dentinari, considerată ca efect secundar al produselor antimicrobiene studiate, ar trebui luate în considerare din punct de vedere clinic datorită potențialului de inducere a hipersensibilității dentinare.

Studiu 3. “Matrix-assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) pentru screening-ul bacteriomului subgingival la un grup de pacienți tratați pentru parodontită”

Introducere. În parodontologie, tehnicile moleculare sunt considerate superioare față de metodele convenționale de cultivare și le-ar putea înlocui cu succes ca standard de aur în diagnosticul microbiologic de laborator al parodontitei atunci când este indicat. Trecerea de la tehnici clasice de identificare prin cultură la teste moleculare a reprezentat o evoluție importantă, deoarece primele nu necesită precauții pentru menținerea viabilității bacteriene de la recoltare și până la însămânțare, evită etapele laborioase ale cultivării, se adresează și bacteriilor necultivabile și se realizează repede. Comparându-se acuratețea testelor moleculare cu cele standard de cultivare în identificarea bacteriilor subgingivale, s-a raportat că unii parodontopatojeni (*Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*) au fost detectați mai frecvent de testele comerciale decât de cele standard, posibil pentru că au evitat greutățile de cultivare și de identificare ale bacteriilor anaerobe dintr-o floră polimorfă.

Obiectiv. Scopul principal al acestui studiu a fost de a utiliza analiza MALDI-TOF MS în asociere cu metoda culturii bacteriene pentru a evalua compoziția bacteriană subgingivală la pacienții cu parodontită, înainte și după terapia parodontală cauzală (instrumentarea mecanică subgingivală asociată cu preparat adjuvant).

Material și metodă. Un grup de pacienți diagnosticați cu parodontită au fost tratați prin instrumentare mecanică supra- și subgingivală și aplicații locale adjuvante antimicrobiene. De la fiecare pacient, probele de placă bacteriană subgingivală au fost recoltate din cinci pungi parodontale înainte și după tratamentul parodontal cauzal. Probele au fost cultivate în condiții aerobe și anaerobe, iar coloniile microbiene au fost identificate folosind MALDI-TOF-MS. Analiza datelor a raportat microbiota în cele două momente de timp.

Rezultate. Un total de 36 de specii microbiene din 9 familii au fost identificate în grupul de studiu. Toate speciile complexului portocaliu au fost identificate. Distribuția pe specii și pe familii a lotului de studiu, înainte și după tratament s-a prezentat utilizând o procedură de analiză bazată pe prezența/absența aplicată fiecărei specii, pentru fiecare pacient. Pentru majoritatea speciilor bacterine, detectarea inițială a depășit ratele post-tratament.

Concluzii. Analiza MALDI-TOF MS a arătat modificări ale microbiotei subgingivale după tratamentul parodontal cauzal. Analiza MALDI-TOF MS a identificat 36 de tulpini

bacteriene la grupul de pacienți cu parodontită. Tratamentul parodontitei a indus o scădere semnificativă statistic ($p=0,02$) de detectare a membrilor complexului portocaliu.

PhD THESIS

Studies regarding the effect of adjunctive therapy in periodontitis

PhD student **Irina Lupșe**

PhD supervisor Prof.dr. **Alexandra Roman**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CONTENT

INTRODUCTION	13
CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	
1. Oral microbiome	19
1.1. History and generalities	19
1.2. The relationship between the oral microbiome and various systemic diseases	20
1.3. Periodontitis - an infectious disease	22
2. Periodontal pathogens - “key” organisms	25
2.1. Consequences of life in the subgingival polymicrobial community	25
2.2. Periodontopathogenic bacteria in the community - multiple roles, a single microorganism	26
2.3. <i>Porphyromonas gingivalis</i> - a key periodontal pathogen	29
3. Non-surgical periodontitis therapy	33
3.1. Justification for the use of adjunctive therapy	33
3.2. Adjunctive effect of chlorhexidine	34
3.3. Adjunctive effect of povidone iodate	36
PERSONAL CONTRIBUTION	
1. Working hypothesis / objectives	39
2. General methodology	41
3. Study 1 – Cytotoxic effects on gingival mesenchymal stromal cells and root surface modifications induced by some local antimicrobial products used in periodontitis treatment	45
3.1. Introduction	45
3.2. Working hypothesis	50
3.3. Material and method	50
3.4. Results	54
3.5. Discussions	58
3.6. Conclusions	64
4. Study 2 - The effect of local antimicrobial substances on root surfaces	67
4.1. Introdudere	67
4.2. Working hypothesis	71
4.3. Material and method	71
4.4. Results	76
4.5. Discussions	82
4.6. Conclusions	86
5. Study 3 - Matrix - Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) for screening the subgingival bacteriome in a group of patients treated for periodontitis	89
5.1. Introduction	89
5.2. Workin hypothesis	91
5.3. Material and method	91
5.4. Results	95
5.5. Discussions	100

5.6. Conclusions	102
6. General conclusions	103
7. Originality and innovative contributions of the thesis	107
REFERENCES	109

Keywords: Periodontitis, Oral microbiome, Adjunctive therapy, Cell cultures

INTRODUCTION

Despite the evolution in the field related to treatment and firm screening protocols, periodontitis remains a major public health problem due to its high prevalence among the population. More than half of people has periodontitis, which leads to major oral health problems, affects the quality of life of individuals, impacts systemic health and last but not least is an important economic burden on the health system.

The conduct of doctoral research is based on the inconsistent information provided by the literature reports on the use of antimicrobial products for local adjuvant applications in the treatment of periodontitis and the lack of firm recommendations on the preferential use of certain products.

Although recent information has associated adjuvant local antibiotic products of standard subgingival mechanical instrumentation therapy with statistically significant positive changes in terms of depth of probe depth and attachment gain compared to subgingival mechanical instrumentation, the clinical relevance of the benefits is a subject of debate. Moreover, the problems related to the possible cytotoxicity associated with these products have not been elucidated. In this context, the original elements of the doctoral research derive from the complex study of three less investigated commercial antimicrobial adjuvant products implying the development of *in vitro* and clinical studies.

CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

This section covers three chapters on the oral microbiome, key periodontal pathogens, and various antimicrobial adjuvants.

The bibliographic study focused on recent epidemiological data of the oral microbiome and its reality with various systemic diseases. This part of the thesis also provides data on the importance of periodontal pathogens, consequences of community life and the effect that adjuvant therapy has on periodontal non-surgical treatment.

Periodontitis is recognized as a chronic, multifactorial, inflammatory disease with an infectious etiology. Subgingival bacteria are formed in the production of this condition, forming a highly organized consortium, which has a high virulence compared to the individual component microorganisms. Recent ideas support the dysbiosis of subgingival microorganisms as having an etiological role and the progression of periodontitis. The current treatment aims primarily to reduce the subgingival bacterial load and rebalance local dysbiosis. Periodontitis is often

treated using a combined mechanical and anti-infective approach.

The analysis on the recent studies available in the specialized literature, constitutes the theoretical framework on the basis of which the three personal research lines were carried out during the doctoral studies.

PERSONAL CONTRIBUTION

Specific working protocols have been developed for the conduct of doctoral research in accordance with the law, for each of the studies carried out, according to national and European ethical norms. The approvals were obtained from the Ethics Commission of the "Iuliu Hațieganu" University of Medicine and Pharmacy, Cluj-Napoca (80 / 1.02.2018) and from the Ethics Commission of the Emergency County Clinical Hospital, Cluj-Napoca (10539 / B / 4.05.2018).

The recommendations of the Helsinki Declaration on Research on Human Subjects were taken into account in conducting doctoral research. Prior to inclusion in the study, each patient was informed of how the study was conducted and then signed the informed consent. The informed consent was obtained both for patients included in clinical trials and for patients from whom tissues were collected for in vitro studies.

The results derived from personal contributions were published in three articles: two articles in ISI journals with impact factor: Materials (Basel) and the Romanian Journal of Laboratory Medicine - 2021,2022) and an article in a journal CNCSIS B + (Romanian Journal of Dentistry - 2018).

STUDY 1. "The cytotoxic effect on gingival stromal mesenchymal cells induced by some local commercial antimicrobial products used in the treatment of periodontitis"

Introduction. Periodontal tissues contain stromal mesenchymal cells capable of restoring structure and function, but the capacity for intrinsic regeneration of the periodontium is limited. Periodontal mesenchymal stromal cells communicate with neighboring structures and adjacent cells, producing favorable responses in terms of tissue regeneration. However, even the smallest changes in the local microenvironment affect the behavior of stromal mesenchymal cells and their regenerative potential. Thus, the protection of local cells against the harmful effects of periodically applied periodontal therapies seems to be a rational target in the treatment of periodontitis. Although effective in terms of antimicrobial effect, subgingival substances can exert a number of local toxic effects. Some commercial products based on chlorhexidine, doxycycline hyclate or minocycline gel, metronidazole gel, sodium hypochlorite, povidone iodine, silver nanospheres or sulfonic acids are currently commercially available and are used in clinical practice as local adjuvant therapies for instrumentation. subgingival, mainly due to their antimicrobial effect.

Objective. The study aimed to investigate the effect of a commercial product based on sulfonic / sulfuric acids on the proliferation and viability of stromal mesenchymal cells isolated from gingival tissue compared to the effects induced by two less studied commercial products, one based on sodium hypochlorite and another based on silver nanoparticles. For the purpose of this study, the following null hypothesis was tested: the biocompatibility of the tested commercial products did not vary with the change

in product concentrations.

Material and method. This study used gingival stromal mesenchymal cells harvested, cultured and fully characterized by the research team. Three commercially available adjuvanted antimicrobial products used for subgingival mechanical instrumentation were used: Hybenx (Epien Medical, St. Paul, MN, USA), Perisolv (RLS Global, Gothenburg, Sweden), Perioflush (Dental Life Sciences, Wigan, UK). For this purpose, experimental culture media were prepared by supplementing the standard culture medium with different concentrations of the three commercial products. Gingival mesenchymal stromal cells were cultured in experimental culture media. The proliferative capacity of gingival stromal mesenchymal cells was tested using the Cell Counting Kit-8 (CCK8) method, after 3 and 5 days of culture in experimental growth media. Also, after 24 hours of culturing the gingival mesenchymal stromal cells in the experimental medium, the MTT test (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) was performed to assess cell survival as an expression of antimicrobial-induced cytotoxicity. For the control group, gingival mesenchymal stromal cells cultured in standard culture medium were used. All experiments were performed in triplicate.

Results. After 48 hours, the optical density values indicating cell proliferation after exposure to different concentrations of Hybenx did not differ statistically significantly. After 5 days of culture, the 50% Hybenx concentration significantly inhibited cell proliferation compared to the 5% Hybenx concentrations ($p = 0.001$), 2% Hybenx ($p = 0.003$) and the control medium ($p = 0.001$). Regarding exposure to Perioflush, optical densities after 48 hours indicated significantly lower proliferation values for cells cultured in experimental media containing 50% and 20% Perioflush, respectively, compared to cells cultured in the control medium ($p = 0.002$ and $p = 0.014$). Statistically significant differences in cell proliferation values were identified for the current 5 days between 10% Perisolv vs. 10% Perioflush ($p = 0.058$). For the lowest concentration, significant differences were calculated between the optical density values at 48 hours between 2% Hybenx vs. 2% Perioflush ($p = 0.045$) and 2% Perisolv vs. 2% Perioflush ($p = 0.036$), and at the time of 5 days the statistically significant differences were between 2% Perisolv vs. 2% Perioflush ($p = 0.036$).

Conclusions. The three commercial products used as antimicrobial adjuvants in subgingival mechanical instrumentation induced dose-dependent cytotoxicity in reducing the proliferation of gingival stromal mesenchymal cells. The silver nanoparticle product at culture medium concentrations of 50%, 20% and 10% also significantly inhibited the viability of gingival mesenchymal stromal cells compared to the standard control medium.

Study 2. "The effect of local antimicrobial substances on root surfaces"

Introduction. Beyond infection control, the ideal result of periodontal treatment is to obtain periodontal regeneration. However, periodontal regeneration following post-therapeutic healing is unpredictable, even under the conditions of an additional surgical interventional approach when only partial regeneration is best obtained. Unlike the repair healing pattern, periodontal regeneration means the *de novo* formation of lost periodontal structures by mimicking the embryonic mechanisms involved in the development of the periodontium. In this context, several adjuvant

treatments have been proposed to obtain a decontaminated root surface. The use of chemical agents is proposed in order to biomodify the root surfaces and to stimulate healing. The action of the chemical agents facilitates the detachment of the tartar deposits, the dissolution of the remaining dentinal detritus, the decalcification of the instrumented root surfaces and the exposure of the collagen fibers at the dentinal or cementum level.

Objective. The present study aimed to assess the effects of a desiccant based on sulfonic acids / sulfuric acid on root structures and on the adhesion of mesenchymal stromal cells of gingival-prerequisite for the induction of optimal reparative / regenerative phenomena. The effects of the desiccant were evaluated against two other local commercial adjuvants, one based on sodium hypochlorite and the other based on silver nanoparticles.

Material and method. The present study used the same gingival mesenchymal stromal cells as in study 1. For the purpose of this study, the roots of the extracted teeth were manually instrumented. From the level of the mechanically instrumented roots, root samples of standard size were obtained, which were divided into four groups: a control group and a group treated with one of the three commercial products. Then, the gingival mesenchymal stromal cells were cultured onto the root samples. The study used SEM observation to assess changes in root samples induced by scaling associated with each of the commercial products and to determine the adhesion of gingival stromal mesenchymal cells to treated samples. All experiments were performed in triplicate.

Results. SEM observations assessed changes in root samples after performing manual instrumentation with the Gracey curette associated with one of the local adjuvant commercial products as well as the adhesion of gingival stromal mesenchymal cells to the treated samples. It has been observed that, in general, the samples treated by manual instrumentation are covered by a layer of continuous detritus which gives the surface a generally smooth appearance. At higher magnifications, the hand-instrumented root surface has a rougher appearance induced by the detritus layer. The overall appearance of the instrumented samples observed at low magnitude is relatively homogeneous with very rare curettage-induced streaks. No significant loss of hard structures, instrumentation ditches or uneven aspects of instrumented surfaces was observed.

Conclusions. After manual scaling with Gracey curettage, the root samples were covered with a layer of compact remnant detritus resulting in relatively smooth and homogeneous surfaces. Hybenx and Perisolv induced more uniform and stable root surfaces due to more efficient removal of residual detritus. Samples treated with manual instrumentation and Perioflush showed an abundant deposit of detritus which gives a rough appearance to the surfaces. The opening of the dentinal tubules, considered as a side effect of the studied antimicrobial products, should be appreciated from a clinical point of view due to the potential to induce dentinal hypersensitivity.

Study 3. “Matrix-assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) for screening the subgingival bacteriome in a group of patients treated for periodontitis”

Introduction. In periodontics, molecular techniques are considered superior to conventional methods of cultivation and could successfully replace them as a gold standard in the laboratory microbiological diagnosis of periodontitis when indicated. The transition from traditional culture identification techniques to molecular tests has been an important development, as the former do not require precautions to maintain bacterial viability from harvesting to sowing, avoid laborious stages of cultivation, address uncultivable bacteria and are done quickly. . Comparing the accuracy of molecular tests with standard culture tests in the identification of subgingival bacteria, it was reported that some periodontopathogens (*Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*) were detected more frequently by commercial than standard tests, possibly because they avoided culture weights and identification of anaerobic bacteria in a polymorphic flora.

Objective. The main aim of this study was to use the MALDI-TOF MS analysis in combination with the bacterial culture method to evaluate the subgingival bacterial composition in patients with periodontitis, before and after causal periodontal therapy (mechanical subgingival instrumentation associated with adjuvant local product application).

Material and method. A group of patients diagnosed with periodontitis were treated by supra- and subgingival mechanical instrumentation and local antimicrobial adjuvant applications. From each patient, samples of subgingival bacterial plaque were collected from five periodontal pockets before and after causal periodontal treatment. Samples were cultured under aerobic and anaerobic conditions, and microbial colonies were identified using MALDI-TOF-MS. The data analysis reported the microbiota in the two time points.

Results. A total of 36 microbial species from 9 families were identified in the study group. All species of the orange complex have been identified. The distribution by species and families of the study group, before and after treatment was presented using an analysis procedure based on the presence / absence applied to each species, for each patient. For most bacterial species, initial detection exceeded post-treatment rates.

Conclusions. MALDI-TOF MS analysis showed changes in the subgingival microbiota after causal periodontal treatment. MALDI-TOF MS analysis identified 36 bacterial strains in the group of patients with periodontitis. Treatment of periodontitis induced a statistically significant decrease ($p = 0.02$) in the detection of members of the orange complex.