

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE “VICTOR BABEȘ”  
DIN TIMIȘOARA  
FACULTATEA DE MEDICINĂ DENTARĂ  
DEPARTAMENT I MD**

**FLOARE DANIEL ALIN**



# **TEZĂ DE DOCTORAT**

**TERAPIA BIO-OXIDATIVĂ CU OZON ÎN MEDICINA  
DENTARĂ**

**- R E Z U M A T -**

Scientific coordinator

**PROF. UNIV. GĂLUȘCAN ATENA, MD PhD**

**Timișoara  
2023**

## CUPRINSUL TEZEI

LISTA LUCRĂRILOR PUBLICATE.....	V
LISTA ABREVIERILOR.....	VI
INDEXUL FIGURILOR .....	VII
INDEXUL TABELELOR.....	IX
INTRODUCERE .....	XI
MOTIVAȚIA ALEGERII TEMEI.....	XI
IMPORTANȚA ȘI ACTUALITATEA TEMEI DE CERCETARE.....	XI
OBIECTIVE ȘTIINȚIFICE PENTRU REZOLVAREA ÎN CERCETAREA DOCTORALĂ .....	XIII
SCURTĂ PREZENTARE A CONȚINUTULUI LUCRĂRII .....	XIII
SINTEZA METODOLOGIEI DE CERCETARE ȘI REZULTATELE PRINCIPALE .....	XIV
<b>1. PARTEA I - PARTEA GENERALĂ .....</b>	<b>1</b>
1. 1 PROPRIETĂȚILE ȘI MECANISMELE DE ACȚIUNE ALE OZONULUI .....	1
1.1.1. ACTIVITATEA ANTIOXIDANTĂ, ANTIINFLAMATOARE ȘI ANTIBACTERIANĂ A OZONULUI .....	2
1.1.2. ACTIVITATEA IMUNOMODULATOARE ȘI BIOSTIMULATOARE A OZONULUI .....	7
1.2. ACȚIUNEA OZONULUI ÎN STOMATOLOGIE .....	10
1.2.1. ACȚIUNEA OZONULUI ASUPRA SMALȚULUI DENTAR .....	11
1.2.2. OZONUL ȘI AGENȚII PATOGENI BUCALI .....	18
1.2.3. TOXICITATEA OZONULUI .....	20
1.3. MODURI DE UTILIZARE ȘI DISPOZITIVE PRODUCĂTOARE DE OZON ÎN STOMATOLOGIE .....	22
3.1. TIPURI DE UTILIZARE A OZONULUI .....	22
3.2. SISTEME DE GENERARE A OZONULUI .....	26
<b>2. PARTEA A DOUA - CONTRIBUȚIA PERSONALĂ .....</b>	<b>27</b>
2.1. OBIECTIVELE ȘI METODOLOGIA CERCETĂRII .....	27
2.1.1. OBIECTIVE.....	27
2.1.2. DIRECȚII DE CERCETARE.....	27
2.1.3. METODOLOGIE - BAZA DE DATE ȘI METODE DE PRELUCRARE .....	27
2.2. STUDIUL 1 - EVALUAREA POTENȚIALULUI DE REMINERALIZARE A SMALȚULUI DENTAR ȘI DE STOPARE A DETERIORĂRII ÎNȚIALE A SMALȚULUI CU AJUTORUL OZONULUI GAZOS .....	28
2.2.1. INTRODUCERE.....	28
2.2.2. MATERIAL SI METODA.....	28
2.2.4. REZULTATE .....	33
2.2.5. DISCUȚII .....	41
2.2.6. CONCLUZII .....	42
2.3. STUDIUL 2 - EVALUAREA EFECTULUI BIO-OXIDATIV ȘI A CITOTOXICITĂȚII OZONULUI GAZOS ASUPRA FIBROBLASTELOR GINGIVALE (HGF) ȘI A KERATINOCITELOR GINGIVALE (PGK) - STUDIU IN VITRO .....	43
2.3.1. INTRODUCERE .....	43
2.3.3. MATERIAL ȘI METODA .....	44
2.3.4. REZULTATE .....	46
2.3.5. DISCUȚIE .....	50
2.3.6. CONCLUZII: .....	52

2.4. STUDIUL 3 - IMPACTUL OZONULUI ASUPRA CARACTERISTICILOR MORFOLOGICE ȘI MICROSTRUCTURALE ALE SMALȚULUI DENTAR - STUDIU IN VITRO, ANALIZĂ SEM (MICROSCOP ELECTRONIC CU SCANARE) ȘI LTF (TEHNOLOGIE DE FLUORESCENȚĂ LASER) .....	53
2.4.1. INTRODUCERE .....	53
2.4.3. MATERIALE ȘI METODA .....	55
2.4.4. REZULTATE .....	57
2.4.5. DISCUȚIE .....	64
2.4.6. CONCLUZII .....	65
2.5 STUDIUL 4 -Îmbunătățirea efectului antimicrobian al ozonului cu ulei esențial de Mentha Piperita .....	66
2.5.1 INTRODUCERE .....	66
2.5.2 SCOPUL STUDIULUI .....	67
2.5.3 MATERIAL ȘI METODA.....	67
2.5.4. REZULTATE.....	71
2.5.5. DISCUȚIE .....	84
2.5.6. CONCLUZII .....	88
3. DISCUȚII GENERALE .....	89
4. ELEMENTE DE ORIGINALITATE .....	91
5. CONCLUZII .....	93
BIBLIOGRAFIE.....	96
ANEXE.....	I

## INTRODUCERE

Ozonul ( $O_3$ ) este un compus natural care reprezintă forma triatomică a oxigenului. Este prezent în mod natural sub formă de gaz în stratosferă pentru a proteja organismele vii de radiațiile UV (ultraviolete), este derivat din oxigen prin acțiunea luminii UV și a descărcărilor electrice. Ozonul este foarte instabil (timp de înjumătățire de 40 de minute la  $20^\circ C$ ) și se descompune rapid în alotropul său diatomic, ceea ce explică cantitățile foarte mici de ozon din atmosferă în comparație cu oxigenul. Ozonul este recunoscut ca un oxidant puternic și, prin urmare, a fost propus ca dezinfectant, deodorant, agent de curățare și de albire, aditiv alimentar și purificator de aer/apă.

Oamenii de știință descoperă din ce în ce mai mult că terapia biooxidativă este mult mai complexă și mai importantă decât se cunoștea anterior. Există multe teorii cu privire la diferitele funcții ale oxigenului și hidrogenului în organism și se prezintă o mulțime de dovezi științifice care să susțină aproape fiecare dintre aceste teorii. Atunci când este administrat sub formă gazoasă, este un amestec gazos de oxigen-ozon, în care ozonul nu reprezintă mai mult de 5% din total.

Medicina bio-oxidativă, prin terapiile sale, oferă organismului mai mult oxigen, îl oxigenează și crește în special absorbția și utilizarea oxigenului la nivel celular. Adăugarea unui plus de oxigen are numeroase beneficii atât pentru prevenirea, cât și pentru tratamentul multor tipuri de afecțiuni. Prin creșterea disponibilității intracelulare a oxigenului, celulele încep să oxideze toxinele acumulate, să le elimine, celulele se regenerează și inevitabil, țesuturile se regenerează. Pe de altă parte, reacția chimică care implică oxigenul este cunoscută sub numele de oxidare. Reacțiile de oxidare pot fi lente sau rapide. Corpul uman nu ar putea supraviețui fără reacții de oxidare. În context biochimic, oxidarea se referă la pierderea sau transferul de electroni de la un atom sau o moleculă la alta, astfel că subprodusul natural al metabolismului fiziologic al oxigenului duce la formarea de specii reactive de oxigen, numite radicali liberi. Speciile reactive de oxigen joacă un rol important într-un număr foarte mare de procese biologice. Multe dintre ele sunt necesare pentru viață, cum ar fi prima linie de apărare împotriva bacteriilor, virusilor și paraziților de către anticorpi și fagocite, cum ar fi granulocitele și macrofagele. Radicalii liberi ai oxigenului sunt peroxizii, superoxizii, radicalii hidroxil și oxigenul. Aceștia sunt derivați din oxigenul molecular în condiții de reducere chimică. Creșterea excesivă a acestor radicali liberi, poate duce la distrugerea structurilor celulare, fenomen cunoscut sub numele de stres oxidativ, care apare într-un dezechilibru care favorizează pro-oxidanții în detrimentul antioxidantilor.

Prezenta lucrare de doctorat reprezintă o sinteză analitică și critică a utilizării principiilor bio-oxidative ale ozonului în medicina dentară. Multe dispozitive și produse pentru utilizarea ozonului în stomatologie, care pot fi găsite pe piața dispozitivelor medicale, au puține dovezi științifice publicate în domeniul medicinei dentare.

**Obiectivul principal** al tezei este de a evalua efectele biologice ale oxigenării prin ozonare, asupra țesuturilor moi și dure din cavitatea bucală. Teza își propune să identifice protocoalele de utilizare a ozonului în stomatologie: eficiența timpului și a tipului de ozonare asupra factorilor patogeni care determină patologiiile orale principale: caria dentară și boala parodontală. Obiectivul tezei este realizat prin:

1. Evaluarea in vivo a efectelor biologice ale ozonului gazos asupra procesului de remineralizare a smalțului dentar, potențialul ozonului de remineralizare imediat și în timp.
2. Evaluarea citotoxicității (in vitro) gazului ozonat asupra celulelor specifice țesuturilor moi Fibroblaste gingivale (HGF) și Keratinocite gingivale (PGK).
3. Analiza efectului biooxidativ și a modificărilor microstructurale ale smalțului dentar în urma utilizării ozonului la diferite intervale de timp.
4. Evaluarea efectului antibacterian al ozonului gazos împreună cu uleiul esențial de *Mentha piperita* (MpEO)

Teza este structurată conform standardelor în 2 părți, Partea generală (Analiza literaturii) și Partea specială sau contribuțiile personale.

**Partea Generală** reprezintă 1/3 din teză și cuprinde următoarele capitole: Proprietățile și mecanismele de acțiune ale ozonului (capitolul 1), acțiunea ozonului în medicina dentară (capitolul 2), metode de utilizare și dispozitive de producere a ozonului utilizate în medicina dentară (capitolul 3).

**Partea Specială** reprezintă 2/3 din teză și este structurată în 4 studii, după cum urmează

1. Evaluarea potențialului de remineralizare a smalțului dentar și de stopare a leziunii inițiale a smalțului cu ajutorul ozonului gazos.
2. Evaluarea efectului bio-oxidativ și al citotoxicității ozonului gazos asupra celulelor gingivale: fibroblaste gingivale (HGF) și keratinocite gingivale (PGK).

3. Evaluarea impactului ozonului asupra caracteristicilor morfologice și microstructurale ale smalțului dentar - studiu in vitro, analiză SEM (microscop electronic cu baleiaj) și LTF (tehnologie de fluorescență laser)

4. Analiza potențialul antimicrobian al ozonului singur sau în combinație cu *Mentha piperita* împotriva bacteriilor orale: *Escherichia coli* (*E.Coli*), *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*), *Pseudomonas aeruginosa* (*P.aeruginosa*), *Streptococcus mutans* (*S.mutans*), și fungilor *Candida albicans* (*C.albicans*), la diferite momente de expunere.

În primele două studii, ozonul produs de HealOzone (KaVo, Biberach Germany) a fost aplicat *in vivo* pe 68 de M1 (primii molari permanenți), atât maxilari, cât și mandibulari, pe suprafețele ocluzale la nivelul șanțurilor și fisurilor. Molarii incluși în studiu au înregistrat valori între 13 și 24 conform scalei DIAGNOdent Pen 2190- corespunzătoare leziunilor initiale de smalt, acesta fiind principalul criteriu de includere/excludere pentru molarii investigați. Rezultatele ozonării smalțului dentar corespunzător leziunii initiale la un timp de expunere de 40s a demonstrat remineralizarea smalțului imediat după expunerea la ozon și la un interval de o luna de la expunerea inițială.

Deoarece gazul poate intra în contact cu celulele gingivale primare în timpul procesului de ozonare, atât fibroblastele gingivale umane, cât și keratinocitele au fost expuse la diferite doze de ozon (20 s, 40 s, 60 s), iar efectele acestuia au fost observate cu ajutorul microscopului inversat Olympus IX73. Contactul ozonului cu celulele gingivale primare umane demonstrează sensibilitatea celulară la acțiunea ozonului, aceasta fiind mai mare în cazul fibroblastelor comparativ cu keratinocitele, dar nu este considerată toxică deoarece toate modificările sunt reversibile la 48 de ore de la expunere.

În cel de-al treilea studiu, ozonarea a fost realizată cu O<sub>3</sub> gazos produs de HealOzone X4, (KaVo, Biberach Germany), la diferite intervale de expunere, pe smalț demineralizat în prealabil până la valoarea de leziune de smalt, măsurat cu ajutorul dispozitivului DiagnoDent Pen 2190. Smalțul demineralizat și ozonat, a fost analizat la nivel microstructural cu Microscopul Electronică de Scanare (SEM). Rezultatele au arătat că expunerea la O<sub>3</sub> timp de 40-50 de secunde îmbunătățește microstructura smalțului și asigură o rată de remineralizare între 96,82-97,38%. În căutarea unor noi soluții minim invazive în tratamentul cariilor și pentru a oferi un suport antimicrobian cavității orale utilizarea O<sub>3</sub> ca terapie alternativă la soluțiile clasice poate fi o soluție viabilă în medicina dentară

Cel de-al patrulea studiu a avut ca scop obținerea și analiza uleiului esențial de *Mentha piperita* (MpEO) în perspectiva utilizării acestuia ca agent de îmbunătățire a potențialului antimicrobian al ozonului împotriva bacteriilor și ciupercilor gram-pozitive și gram-negative. Cercetarea a fost efectuată pentru diferite durate de expunere și a obținut relații timp-doză și corelații timp-efect. Uleiul esențial de *Mentha piperita* (MpEO) a fost obținut prin hidrodistilare și analizat ulterior cu ajutorul GC-MS. Testul de microdiluție în bulion a fost utilizat pentru a determina inhibiția tulpinii/creșterea masei tulpinii prin citirea spectrofotometrică a densității optice (OD). S-au calculat ratele de creștere bacteriană/micelică (BGR/MGR) și ratele de inhibiție bacteriană/micelică (BIR/MIR) după tratamentul cu ozon în prezența și absența MpEO asupra tulpinilor ATTC; s-au determinat concentrația minimă de inhibiție (MIC) și interpretările statistice ale relației timp/doză și corelațiile specifice ale testului t. Efectul ozonului asupra următoarelor tulpini testate la eficiență maximă a fost observat după 55 s de expunere unică la ozon, în ordinea intensității efectului: *S. aureus* > *P. aeruginosa* > *E. coli* > *C. albicans* > *S. mutans*. În cazul ozonului cu adaos de 2% MpEO (MIC), eficacitatea maximă a fost înregistrată la 5 s pentru aceste tulpini, în ordinea intensității efectului: *C. albicans* > *E. coli* > *P. aeruginosa* > *S. aureus* > *S. mutans*. Rezultatele sugerează o nouă dezvoltare și afinitate în ceea ce privește membrana celulară a diferitelor microorganisme testate. Astfel, utilizarea ozonului, combinat cu MpEO, este susținută ca o terapie alternativă în biofilmul plăcii bacteriene și sugerată ca fiind utilă în controlul microorganismelor care stau la baza dezvoltării bolilor orale în medicina dentară

Concluziile finale ale acestei teze sunt enumerate mai jos:

1. Conservarea țesuturilor sănătoase, intervențiile minim invazive și stimularea proceselor regenerative prin inginerie tisulară sunt tot mai des discutate în stomatologia contemporană.

2. Medicina bio-oxidativă, prin terapiile sale, oferă organismului mai mult oxigen și îmbunătățește în special absorbția și utilizarea oxigenului la nivel celular. Adăugarea de oxigen suplimentar are numeroase beneficii atât pentru prevenirea, cât și pentru tratamentul afecțiunii orale specifice.

3. Unul dintre obiectivele principale ale tezei este de a descrie și înțelege efectele O<sub>3</sub> asupra smalțului dentar. S-a constatat că există diferențe semnificative din punct de vedere statistic între evaluarea inițială și cea post-O<sub>3</sub> ( $p < 0,05$ ), precum și între valorile de mineralizare post-O<sub>3</sub> și cele de o lună ( $p < 0,05$ ).

4. Între situația inițială și cea post-O3, diferența dintre gradul de mineralizare este semnificativă din punct de vedere statistic. (Mineralizarea a fost ( $m = 1,77$  și eroare standard  $= 2,51$ ,  $p < 0,05$ )

5. O expunere de 40 s la smalțul dentar O3 (HealOzone X4) este suficientă pentru a remineraliza o leziune superficială a smalțului ocluzal (DIAGNOdent Pen 2190- valoarea 15-24) la valoarea smalțului sănătos (0-140)

6. Poziția dinților în cavitatea orală nu influențează procesul de mineralizare O3. După aplicarea inițială și după o lună de la aplicarea ozonului, au existat diferențe semnificative între cei 4 molari de pe arcada dinților testați, dar am constatat că diferențele medii nu au fost semnificative din punct de vedere statistic,  $p = 0,349$ .

7. Procesul de remineralizare a fost inițiat imediat, dar a continuat în următoarele 30 de zile, iar cu cât demineralizarea unităților dentare a fost mai mare, cu atât procesul de remineralizare a fost mai eficient.

8. Expunerea smalțului la ozon gazos (10, 20, 30, 40, 50 s) îmbunătățește semnificativ proprietățile microstructurale ale smalțului dentar. Fenomenele de îmbunătățire a calității smalțului sunt și mai pronunțate după expunerea de 50 s la tratamentul cu ozon.

9. Aceste modificări depind de timpul de expunere și de posibilitatea de a perturba proteinele încorporate în matricea smalțului prin biooxidare.

10. Imaginile SEM după ozonizarea de 50 de secunde, arată o nivelare a suprafeței smalțului, canale interprismatice deschise și ordonarea prismelor. Cu cât expunerea a fost mai mare, cu atât s-a observat o structură mai ordonată a prismelor de hidroxiapatită și eliberarea spațiilor interprismatice.

11. Având în vedere utilizarea pe scară largă a ozonului ca terapie pentru o multitudine de afecțiuni dentare, a devenit obligatorie evaluarea potențialului citotoxic al ozonului asupra țesuturilor moi și a celulelor orale (keratinocite și fibroblaste) din țesutul gingival care intră în contact strâns cu acest agent.

12. Studiul de față a arătat că expunerea la 20, 40 și 60 s de ozon gazos a provocat un răspuns dependent de tipul de celulă, după cum urmează: keratinocitele gingivale- PGK (care formează stratul exterior al gingiei) au fost afectate de ozon după 60 s de expunere (modificări ale morfologiei celulare și o scădere a confluenței), în timp ce în cazul HGF-fibroblaștilor gingivali, modificările morfologice au fost observate la cel mai scurt interval de expunere - 20 s.



13. Rezultatele studiului arată o sensibilitate crescută a fibroblastelor gingivale la expunerea la gazul de ozon în comparație cu keratinocitele și ar putea fi folosite ca bază pentru cercetări ulterioare privind efectele citotoxice ale ozonului gazos.

14. În căutarea unor soluții antimicrobiene alternative la antibioticele de sinteză, utilizarea ozonului în combinație cu uleiuri esențiale poate reprezenta o soluție viabilă cu aplicații în medicină și medicina dentară. Rezultatele obținute evidențiază faptul că asocierea ozonului cu MpEO conduce la o creștere a eficienței acestuia și la o scădere a timpului de expunere.

Utilizarea O<sub>3</sub> în medicină necesită stabilirea unor protocoale clare și precise în ceea ce privește timpul și doza de utilizat. Teza aduce o contribuție valoroasă cu privire la implementarea unor tehnologii regenerative, non invazive de utilizarea a bio-oxidării cu ozon în medicina dentară. Lucrarea de față aduce dovezi științifice, care susțin utilizarea ozonului gazos sau a derivatelor de ozon în cadrul terapiilor bioogice non invazive în medicina dentara moderna, conservativă.