



**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
„CAROL DAVILA” BUCUREȘTI  
ȘCOALA DOCTORALĂ  
DOMENIUL STOMATOLOGIE**

**CONSIDERAȚII ASUPRA UTILIZĂRII LASERULUI  
ÎN TERAPIA ENDODONTICĂ**

**REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT**

**Conducător de doctorat:**

**PROF. UNIV. DR. ECATERINA IONESCU**

**Student-Doctorand:**

**DR. ANDREI VASILACHE**

**2023**

## CUPRINS

<b>INTRODUCERE</b>	<b>6</b>
<b>PARTEA I. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII</b>	<b>11</b>
<b>Capitolul 1. Noțiuni generale despre laser</b>	<b>12</b>
1.1. Istoricul și evoluția laserilor	12
1.2. Principii generale de generare a luminii laser	16
1.3. Dispozitive laser: caracteristici	20
1.3.1 Elementele componente ale unui dispozitiv laser	20
1.3.2 Proprietățile laserilor	23
1.3.3 Tipuri de laseri: clasificare	26
1.4. Efectele laserului la interacțiunea cu țesuturile biologice	28
1.4.1. Tipuri de interacțiuni ale laserului cu țesuturi țintă	28
1.4.2. Efectele biologice la interacțiunea laserului cu țesuturi țintă	31
<b>Capitolul 2. Mecanismul de acțiune al laserului la nivelul structurilor biologice</b>	<b>33</b>
2.1. Mecanismul de acțiune al diferitelor tipuri de laser la nivelul structurilor biologice	33
2.1.1. Efectele temperaturii asupra țesuturilor moi	37
2.1.2. Efectele temperaturii asupra țesuturilor dure	38
2.2. Răspunsul celular (foto-bio-modulare)	39
2.3. Dozarea radiațiilor laser	39
2.4. Securitatea utilizării laserului în cabinetul stomatologic	41
<b>Capitolul 3. Aplicațiile laserului în stomatologie și endodonție</b>	<b>44</b>
3.1. Aplicații ale laserului în stomatologie	44
3.2. Aplicații ale laserului diodă în endodonție	44
3.3. Aplicații ale laserului diodă combinat cu soluții de irigare clasice și alternative în terapia endodontică	49
<b>PARTEA II. CONTRIBUȚII PERSONALE</b>	<b>56</b>
<b>Capitolul 4. Metodologia generală a cercetării științifice</b>	<b>57</b>
4.1. Scopul și obiectivele cercetării	57
4.2. Materiale folosite în studiu	59
4.2.1. Dispozitivul laser utilizat	59

4.2.2. Produse naturale vegetale și solvenți folosiți în studiile efectuate	61
4.2.3. Culturi celulare	62
4.3. Metoda de lucru	62
4.4. Prelucrarea datelor cercetării	67
<b>Capitolul 5. Evaluarea in vitro a eficienței laserului cu diodă și a terapiei fotodinamice asupra viabilității microbiene</b>	<b>68</b>
5.1. Introducere	68
5.2. Material și metodă	71
5.3. Rezultate și discuții	72
5.4. Concluzii	105
<b>Capitolul 6. Studiu privind evaluarea potențării efectului antimicrobian (calitativ și cantitativ) al unor produse naturale, folosite ca adjuvant în terapia endodontică, prin iradierea acestora cu un fascicul al laserului diodă 940 nm</b>	<b>107</b>
6.1. Introducere	107
6.2. Material și metodă	109
6.3. Rezultate și discuții	113
6.4. Concluzii	121
<b>Capitolul 7. Evaluarea biocompatibilității produselor naturale, folosite ca adjuvante în irigarea și igienizarea canalelor radiculare, iradiate cu un fascicul al laserului diodă 940 nm</b>	<b>122</b>
7.1. Introducere	122
7.2. Material și metodă	123
7.3. Rezultate și discuții	125
7.4. Concluzii	132
<b>CONCLUZII GENERALE ȘI CONTRIBUȚII PERSONALE</b>	<b>133</b>
<b>BIBLIOGRAFIE</b>	<b>138</b>
<b>ANEXE</b>	<b>155</b>

## INTRODUCERE

Problematika abordată în cadrul tezei de doctorat este legată de o serie de aspecte fundamentale din domeniul tehnologiei laser pentru aplicații biomedicale și se înscrie între direcțiile principale ale programelor de cercetare prin care se promovează cunoașterea științifică a laserilor folosiți în stomatologie.

Un domeniu important, prin prisma potențialului lucrativ dar și a sănătății populației, este reprezentat de dezvoltarea unor alternative terapeutice biocompatibile, cu funcționalitate ridicată și efecte secundare reduse în cazul aplicațiilor medicale, permițând terapii performante și tratamente de succes.

Tratamentul neinvaziv al bolilor orale, obiectiv major al stomatologiei moderne, încurajează studiul intens al sistemelor laser care pot oferi în prezent noi posibilități terapeutice, cu potențial de a se stabili ca o alternativă mai bună sau ca factor adjuvant la terapia convențională.

Am ales să-mi efectuez cercetarea doctorală în acest domeniu, atât datorită interesului personal pentru terapia cu laser cât și pentru ceea ce reprezintă această nouă tehnică în abordarea complexă tratamentelor endodontice.

Tratamentul endodontic se realizează prin combinarea agenților fizici și chimici, iar unul dintre scopurile acestuia este eliminarea resturilor pulpare, bacteriilor și produselor bacteriene din canalul radicular, în același timp cu dezinfectarea dentinei profunde și a rețelei tubulare, elemente esențiale pentru succesul tratamentului pe termen lung. Datorită numărului mare de microorganisme care prezintă rezistență crescută la tratamentele convenționale, dezvoltarea de noi produse antimicrobiene devine o necesitate.

Preocuparea personală în ceea ce privește reușita tratamentelor endodontice m-a condus spre un studiu aprofundat al aplicabilității laserului diodă cu lungimea de undă de 940 nm și evaluarea in vitro, a eficienței acestuia asupra viabilității unor specii microbiene frecvent întâlnite în etiopatogenia infecțiilor endodontice. Prin studiul efectului sinergic bactericid al laserului cu soluții ale unor extracte naturale din plante activate cu acest tip de laser cu diodă de 940 nm, de mare putere, am încercat să identific potențialul antimicrobian al unor extracte din plante tratate cu laserul diodă 940 nm în vederea obținerii unor noi soluții de irigare, biocompatibile, cu potențiale aplicații în endodonție.

Teza mea de doctorat este structurată în două părți, partea generală și partea personală și cuprinde șapte capitole în care sunt prezentate studii din literatură și contribuții personale privind efectele pe care le are folosirea sistemelor laser ca adjuvant în tratamentul stomatologic și în special în tratamentul endodontic.

Primele trei capitole sunt dedicate părții generale și fac referire la stadiul actual al cunoașterii în domeniul complex al laserilor și utilizarea acestora în stomatologie și endodonție, iar următoarele patru capitole evidențiază metodologia generală a cercetărilor experimentale, studiile propriu zise în concordanță cu obiectivele de cercetare propuse, urmate la final de concluziile generale, contribuțiile personale și anexe.

## **STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII**

### **CAPITOLUL 1. NOȚIUNI GENERALE DESPRE LASER**

Primul capitol al tezei este unul introductiv în care este prezentată o scurtă incursiune în problematica abordată, noțiuni generale despre laser și o serie de elemente legate de generarea luminii laser. Sunt prezentate caracteristicile dispozitivelor laser, respectiv elementele componenete, proprietățile, clasificarea, tipurile de acțiune și efectele produse de laseri la interacțiunea cu țesuturi țintă.

### **CAPITOLUL 2. MECANISMUL DE ACȚIUNE AL LASERULUI LA NIVELUL STRUCTURILOR BIOLOGICE**

Descrierea amănunțită a aspectelor privitoare la stadiul actual al cunoașterii în domeniul laserilor în ceea ce privește mecanismul de acțiune la nivelul structurilor biologice respectiv la nivelul țesuturilor moi și dure, răspunsul celular precum și dozarea și securitatea utilizării laserului, face obiectul capitolului al doilea.

### **CAPITOLUL 3. APLICAȚIILE LASERULUI ÎN STOMATOLOGIE ȘI ENDODONȚIE**

În stomatologie, laserii au devenit un instrument aplicat în multe proceduri, inclusiv chirurgia țesuturilor moi, decontaminare, asigurarea efectelor antiinflamatorii, prepararea cavitațiilor, prevenirea cariilor, decontaminarea leziunilor carioase și îndepărtarea precisă a acestora, ca agenți de gravare și agenți antibacterieni. Ei pot fi utilizați cu succes în terapia endodontică și în tratamentul bolilor parodontale (Shanthala BM și colab., 2017). Tratamentele asistate de laser au potențialul de a se stabili ca o alternativă mai bună la terapia convențională. Cercetarea și utilizarea clinică, după interesul inițial pentru toate utilizările terapeutice posibile ale laserilor în endodonție, se reduc la curățarea și decontaminarea sistemului de canal radicular.

Utilizarea frecventă a laserului diodă în tratamentul endodontic a generat din ce în ce mai frecvent în ultimii ani studii care au evaluat eficiența antibacteriană a laserului diodă cu lungimea de undă de 940 nm, la diferite puteri de ieșire.

În continuare, în capitolul trei, sunt sintetizate informații legate de utilizarea și aplicațiile laserilor în stomatologie și a laserului diodă în endodonție singular sau combinat cu soluții de irigare clasice și alternative

## CONTRIBUȚII PERSONALE

### CAPITOLUL 4. METODOLOGIA GENERALĂ A CERCETĂRII ȘTIINȚIFICE

#### 4.1 Scopul și obiectivele cercetării

*Scopul* cercetării științifice din cadrul tezei mele de doctorat, a fost ca prin studiile efectuate să evaluez in vitro eficiența laserului cu diodă de mare putere, cu lungimea de undă 940 nm, asupra viabilității microbiene, efectul și potențarea efectului antimicrobian al unor extracte din plante, pentru a putea fi folosite ca adjuvant în igienizarea canalelor radiculare, prin iradiere cu fascicul laser precum și evidențierea biocompatibilității acestor produse naturale înainte și după iradierea cu un fascicul al laserului cu lungimea de undă de 940 nm.

În cadrul *primului studiu* al cercetării științifice doctorale am urmărit evaluarea eficienței laserului cu diodă de mare putere, cu lungimea de undă 940 nm și a terapiei fotodinamice antimicrobiană asupra viabilității microbiene și anume asupra celor două specii frecvent implicate în infecțiile endodontice primare sau recurente, deosebit de virulente, respectiv *Enterococcus faecalis* și *Candida albicans*, de altfel microorganisme comune.

În cadrul *celui de al doilea studiu* al cercetării științifice doctorale mi-am propus să investighez in vitro activitatea antimicrobiană a 7 extracte vegetale alcoolice și hidroalcoolice din nuc (*Juglans regia*), salvie (*Salvia officinalis*) și echinacea (*Echinacea purpurea*), înainte și după expunerea la acțiunea unor fascicule laser emise de laserul dioda 940 nm, la 2 variante ale puterii la ieșire de 3W și respectiv 5W, din perspectiva stabilirii eficienței în tratamentul endodontic.

Cel de-al *treilea studiu* in vitro are drept scop evaluarea comparativă a implicațiilor toxicologice potențiale ale extractelor de plante din nuc (*Juglans regia*), salvie (*Salvia officinalis*) și echinacea (*Echinacea purpurea*), și posibilitatea de atenuare a nocivității în afara canalului radicular și de potențare a unor reacții de refacere și vindecare, la nivel celular, consecutive activării prin iradiere cu fascicul laser cu aceleași variante ale puterii la ieșirea prin vârful fibrei de 3W și 5W.

Aceste soluții alternative pentru irigare pe bază de produse naturale, extracte naturale de plante și extracte activate cu un fascicul laser generat de laserul diodă cu lungimea de undă 940 nm, pot să contribuie la dezinfecția canalului radicular, cu posibilitatea de atenuare a nocivității în afara acestuia și de potențare a unor reacții de refacere și vindecare la nivelul țesuturilor periapicale.

#### 4.2 Materiale folosite în studiu

##### 4.2.1 Dispozitivul laser utilizat

Utilizarea frecventă a laserului diodă în tratamentul endodontic a generat din ce în ce mai frecvent în ultimii ani studii care au evaluat eficiența antibacteriană a laserului diodă cu lungimea de undă de 940

nm, la diferite puteri de ieșire. Pe lângă efectul bactericid, laserul cu diodă are un efect biostimulator care este de mare importanță în ceea ce privește vindecarea țesuturilor periapicale.

Am ales să folosesc laserul diodă cu lungimea de undă de 940 nm deoarece aplicarea sa clinică în endodonție a fost mai puțin studiată și, de asemenea, datorită costului redus, versatilității mai mari și portabilității ușoare datorită dimensiunii sale compacte.

În studiile efectuate am utilizat laserul diodă cu lungimea de undă 940 nm, Biolase Epic X (SUA).

#### 4.2.2 Produse naturale vegetale și solvenți folosiți în studiile efectuate

În primul studiu au fost utilizați ca fotosensibilizanți coloranții de fenotiazinium, respectiv o soluție de 5mg/ml de albastru de metilen (AM) și una de albastru de toluidină de 1% (AT) substanțe alese pentru eficacitatea lor în terapia fotodinamică (PDT), datorită prezenței încărcăturii cationice.

În cadrul următoarelor două studii efectuate s-au utilizat extracte vegetale obținute la Facultatea de Biologie, Universitatea din București, preparate din nuc (*Juglans regia*), din salvie (*Salvia officinalis*) și echinacea (*Echinacea purpurea*).

Din nuc (*Juglans regia*) s-au folosit fructele și s-au realizat 4 extracte alcoolice și hidroalcoolice în metanol (metanol 100 % și apă:metanol 1:1 v/v, peste care s-au pus 5 g plantă) și 4 extracte alcoolice și hidroalcoolice în etanol (etanol 100% și apă:etanol 1:1 v/v peste care s-a pus 1g plantă) din următoarele componente: *pericarp și mezocarp* (coaja verde a nucii), *endocarp* (partea lemnoasă a nucii), *tegumentul seminal* (tegumentul care acoperă sămânța), *pereții lemnoși* din interiorul seminței ce separă cotiledoanele și lobi. Fragmentele de coajă verde au fost liofilizate înainte de a fi utilizate.

Din salvie (*Salvia officinalis*) s-a realizat un extract hidroalcoolic în etanol din frunza de salvie (*Salvia officinalis herba*) (extract 1:5, raport alcool etilic 96%:apa = 35:65).

Din *Echinacea purpurea* (părțile supraterane) produsul folosit pentru testare în studiile efectuate a fost tinctura de echinacea gata preparată ce conține *E. purpurea* 20 g și alcool etilic 70% v/v pentru 100 g soluție. Din toate extractele de plante preparate s-au ales următoarele probe cu codificările aferente:

N<sub>5</sub> – extract în metanol din pericarp și mezocarp liofilizate de *Juglans regia*

N<sub>7</sub> – extract în etanol din endocarp de *Juglans regia*

N<sub>11</sub> – extract în metanol din tegument seminal de *Juglans regia*

N<sub>19</sub> – extract în apă:metanol din pericarp și mezocarp de *Juglans regia*

N<sub>20</sub> – extract în apă:metanol din interiorul seminței ce separă cotiledoanele și lobi de *Juglans regia*

S – extract în apă:alcool etilic din *Salvia officinalis*

E – tinctură de Echinacea

3W – extractul de testat tratat cu fascicul laser 3W

5W – extractul de testat tratat cu fascicul laser 5W

Cele 7 extracte netratate reprezintă martorul (control), iar variantele analizate s-au obținut prin tratarea extractelor vegetale cu un fascicul al laserului cu diodă cu lungimea de undă de 940 nm, în modul pulsant (CP2), cu puteri ale fasciculului laser la ieșire de 3W și respectiv 5W.

Aceeași soluție stoc din fiecare extract a fost utilizată în toate determinările aferente.

#### 4.2.3 Culturi celulare

Culturile celulare utilizate în studiile efectuate au fost reprezentate de:

- tulpina bacteriană de referință, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (American Type Culture Collection), provenită din culturi acreditate ATCC;
- tulpina bacteriană standard, *Candida albicans* ATCC 10231 (American Type Culture Collection);
- o linie celulară de cultură L929, cu morfologie de tip fibroblast (ATCC L929).

#### 4.3 Metoda de lucru

În primul studiu testarea influenței laserului cu diodă s-a realizat asupra tulpinilor standard de *Enterococcus faecalis* ATCC (American Type Culture Collection) 29212 și respectiv *Candida albicans* ATCC (American Type Culture Collection) 10231, din care s-a preparat o suspensie de 0,5 standard McFarland în ser fiziologic.

După iradiere s-au realizat diluții seriale din care s-au însămânțat câte 10  $\mu$ L în triplicat și s-a determinat numărul de unități formatoare de colonii per mL (UFC/mL) pentru a determina viabilitatea microorganismelor. Pentru fiecare testare s-au realizat câte 5 replici pentru *E. faecalis* și respectiv 4 replici pentru *C. albicans*.

Pentru a evalua influența volumului suspensiei microbiene iradiate asupra viabilității microorganismelor s-a analizat în paralel aceeași suspensie microbiană de *C. albicans*, repartizată în recipiente diferite și anume 900  $\mu$ L repartizat în recipient cu volum final de 1,5 mL și respectiv 100  $\mu$ L repartizat în recipient cu volum final de 0,2 mL.

Aceeași tulpină bacteriană de referință folosită, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (American Type Culture Collection), în cercetarea efectuată în al doilea studiu a fost însămânțată pe mediu Mueller Hinton agar și TSB (triptone soy broth) la 37°C.

Pentru al treilea studiu fibroblastele (ATCC L929), au fost cultivate în mediu DMEM (Dulbecco s Modified Eagle Medium) suplimentat cu 10 % ser fetal bovin.

Pentru obținerea extractelor din fructele de nuc, extracte alcoolice și hidroalcoolice în metanol și etanol (metanol 100 % și apă:metanol 1:1 v/v, peste care s-au pus 5 g plantă; etanol 100% și apă:etanol 1:1 v/v peste care s-a pus 1g plantă), a fost folosită extracția prin microunde cu extractor Ethos Start D (1 oră la 100°C).



Extractul hidroalcoolic în etanol din frunza de salvie (*Salvia officinalis herba herba*) s-a realizat astfel: frunzele de salvie (*Salvia officinalis herba*) au fost curățate de impurități, spălate și lăsate să se usuce la temperatura camerei, apoi mărunțite cu o moară de laborator și amestecate cu soluția hidroetanolică (extract 1:5, raport alcool etilic 96%:apa = 35:65).

Extracția s-a realizat prin microunde cu extractor Ethos Start D (1 oră la 100°C). Extractele obținute au fost uscate la rotavapor, iar produsul rezultat a fost reluat în DMSO (dimetilsulfoxid) la o concentrație finală 20 mg/mL.

Din *Echinacea purpurea* (adică părțile supratere) produsul folosit pentru testare în studiile efectuate a fost tinctura de Echinacea gata preparată ce conține *E. purpurea* 20 g și alcool etilic 70% v/v pentru 100 g soluție.

Pentru testarea influenței laserului cu diodă asupra viabilității microbiene, în primul studiu, suspensia microbiană (de 0,5 standard McFarland) în ser fiziologic, a fost supusă acțiunii fasciculului laser folosind diferite intensități, timpi de contact și vârfuri de aplicare conform programelor presetate ale dispozitivului și anume IP (pungi parodontale infectate), PP (pungi parodontale), AU (ulcer aftos).

Piesa de mână chirurgicală care distribuie uniform energia razei laser în zona tratată a fost folosită în modul fără contact deoarece utilizată la o distanță variabilă de până la 100 cm nu modifică energia iradierii peste un spot cu diametrul de 1 cm. Piesa de mână este cel mai frecvent utilizată pentru biostimulare și tratament antiinflamator. Pentru testele efectuate în acest studiu au fost folosite vârfurile E3, E4 la piesa chirurgicală.

După iradiere, din suspensiile folosite s-au realizat diluții seriale din care s-au însămânțat câte 10 μL în triplicat și s-a determinat numărul de unități formatoare de colonii per mL (UFC/mL) pentru a determina viabilitatea microorganismelor. Pentru fiecare testare s-au realizat câte 4 și 5 replici.

Pentru al doilea studiu laserul cu lungimea de undă 940 nm a fost setat pentru programul Infected Pockets (pentru infecții în pungile parodontale) și au fost realizate activări ale extractelor de plante selectate pentru testări (N<sub>5</sub>, N<sub>7</sub>, N<sub>11</sub>, N<sub>20</sub>, S, E) la diferite intensități ale puterii de ieșire la vârful fibrei fasciculului laser, începând cu 1W, 1,5W, 2W, 2,5W, 3W, 4W și 5W, folosind vîrfuridiferite pentru activare (E2, E3, E4) și timpi de expunere variabili respectiv de la 10s la 30s, 45s, 60s, 180s cu repetări și reluări succesive pentru fiecare experiment.

Pentru al treilea studiu al cercetării au fost pregătite din fiecare extract de plante ales pentru testare plus tulpina bacteriană, câte 3 eprubete: control, lot iradiat cu fascicul laser cu puterea 3W, lot iradiat cu fascicul laser cu puterea 5W.

Am realizat iradierea folosind vârful E4, neinițiat, timp de 30 secunde și programul presetat (IP) Infected Pockets, în modul pulsant CP2 (Comfort Pulse), cu durata pulsului de 1milisecundă.

Tehnica de lucru pentru activarea extractelor pregătite a constat în introducerea vârfului, vertical în eprubete, cu mișcări circulare executate ușor, de jos în sus, pe întreaga lungime a eprubetei.

La probele și testările preliminare efectuate cu vârfurile E4 inițiate s-a constatat cauterizarea soluției motiv pentru care s-au folosit vârfurile neinițiate.

Evaluarea efectului antibacterian al soluțiilor reprezentate de extractele de plante activate prin iradiere cu fascicul laser cu intensități ale puterii la ieșire de 3W și 5W s-a efectuat prin metoda Kirby-Bauer adaptată.

Determinarea cantitativă a activității antimicrobiene a extractelor analizate s-a realizat prin metoda microdiluțiilor seriale în mediu lichid (Mueller Hinton), în vederea determinării concentrației minime inhibitorii (CMI), adică a cantității minime de compus testat capabilă să inhibe creșterea celulelor microbiene.

Influența compușilor testați asupra dezvoltării de biofilme microbiene pe substrat inert s-a realizat în plăci cu 96 de godeuri în care au fost puse, în contact cu un inocul bacterian cu densitatea de  $10^6$  UFC/mL, diluții binare ale extractelor. Intensitatea suspensiei colorate obținute a fost citită spectrofotometric (Flex Station 3) la o lungime de undă de 492 nm.

În cel de al treilea studiu de evaluare a biocompatibilității, extractele de plante selectate pentru testare (diluție 1:10), au fost iradiate folosind același protocol, cu intensități ale puterii la ieșire a fasciculului laser de 3W și 5W.

Celulele au fost însămânțate la o densitate de  $1,5 \times 10^4$  celule pe godeu în 200  $\mu$ l de mediu de cultură, peste care s-au pus extractele de testat (diluție 1:10) și s-au incubat la 37 °C (5% CO<sub>2</sub>), 24 ore.

Evaluarea gradului de biocompatibilitate (citotoxicitatea materialelor) s-a realizat pe baza testului Mosmann Tetrazolium Toxicity (MTT) și a testului de cuantificare a lactat dehidrogenazei (LDH). Rezultatele s-au citit spectrofotometric (Flex Station 3) la o lungime de undă de 550 nm pentru MTT și la o lungime de undă de 490 nm pentru LDH.

Toate testările au fost efectuate în laboratorul de microbiologie al Facultății de Biologie, Universitatea din București.

#### **4.4 Prelucrarea datelor cercetării**

Datele colectate au fost centralizate și prelucrate statistic folosind programele Microsoft Office Excel/Word 2013 și IBM SPSS Statistics v20, 22.0 (Statistical Package for the Social Sciences for Windows). Variabilele cantitative au fost exprimate sub formă de valori medii cu abatere/deviații standard (SD).

Graficele au fost realizate cu GraphPad Prism 5.04.

Diferențele dintre valorile determinate s-au analizat folosind testul Mann Whitney, un test statistic folosit pentru a evalua diferențele dintre două eșantioane independente în ceea ce privește nivelul oricărei trăsături, măsurat cantitativ, care permite detectarea diferențelor de valoare a unui parametru între eșantioane mici.

Nivelul de semnificație statistică (p) a fost stabilit la maximum 0.05. Valorile  $p < 0,05$  au fost considerate semnificative statistic. Nivelurile de semnificație statistică au fost \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ; \*\*\*\*,  $p < 0.0001$ .

Analiza și interpretarea statistică a rezultatelor cât și compararea acestora cu date din studii de specialitate similare au permis stabilirea concluziilor cercetării mele științifice.

## **CAPITOLUL 5. EVALUAREA IN VITRO A EFICIENȚEI LASERULUI CU DIODĂ ȘI A TERAPIEI FOTODINAMICEASUPRA VIABILITĂȚII MICROBIENE**

### **5.1 Introducere**

Cavitatea bucală umană este un mediu propice formării nelimitate a biofilmului microbial natural. Cu toate acestea, în echilibrul distorsionat al sănătății bucale, agenții patogeni infecțioși pot avea acces în țesuturile dentare și în zona gingivală (Takahashi N, Nyvad B , 2011; Grzech-Leśniak K și colab., 2017, 2019).

Gestionarea infecțiilor cauzate de bacterii și ciuperci este o provocare viabilă în diverse domenii medicale, inclusiv în stomatologie. Dezvoltarea medicinei cu laser a oferit o serie de noi modalități de terapie capabile să elimine organismele patogene, metode alternative de gestionare a rezistenței acestora la medicamente.

În terapia endodontică, eliminarea resturilor pulpare și a populațiilor bacteriene din sistemul de canal radicular este un obiectiv important deoarece infecțiile de la nivelul canalului radicular sunt cauzate de microorganismele care au penetrat pulpa dentară și au reușit să colonizeze și să supraviețuiască la acel nivel. (Wong și colab., 2021).

Deși pregătirea biomecanică poate elimina eficient microorganismele, mai mult de 50% din suprafața pereților pot rămâne intacti în timpul instrumentării, datorită complexității anatomice a sistemului de canal radicular (Stuart CH și colab., 2006). Eradicarea bacteriilor persistente în zonele îndepărtate ale sistemului de canal radicular este o provocare majoră în diferitele tehnici de tratament folosite și este crucială pentru conservarea pe termen lung a dinților tratați endodontic. În timpul infecției de canal, micromediul canalului favorizează selecția câtorva specii bacteriene, dintre care deosebit de virulente sunt *Enterococcus faecalis* și *Candida albicans*, de altfel microorganisme comune, importante, întâlnite la dinții cu infecție endodontică refractară.

*E. faecalis* este un coc anaerob facultativ, gram pozitiv, rezistent la terapie, ce contribuie la eșecul terapiei endodontice prin formarea de biofilm (Eslami L.M. și colab., 2019).

Din acest motiv și datorită faptului că este întâlnit în eșecul recurent al tratamentului endodontic datorită virulenței, controlul său este de o importanță extremă și a devenit din ce în ce mai necesară găsirea de noi instrumente care să ajute la eliminarea *E. Faecalis* (Castilho A L și colab., 2013).

*C. albicans* este o ciupercă identificată în 21% din infecțiile endodontice primare și în 18% din cazurile de retratare (Eslami L M și colab., 2019). *Candida* poate supraviețui în medii extreme prin formarea biofilmului și utilizarea proprietăților sale fizico-chimice pentru a se potrivi condițiilor locale (Silva Garcez A și colab., 2006; De Souza EB și colab., 2008).

O abordare inovatoare pentru dezinfecție în endodonție este utilizarea laserilor. Efectul bactericid potențial al iradierii cu laser poate fi utilizat eficient pentru curățarea suplimentară a sistemului de canal radicular, efect studiat pe larg folosind diferite lasere ca: laserul CO<sub>2</sub>, Nd:YAG, laserul diodă și Er:YAG (Tunér J și colab., 2010; Silva Garcez A și colab., 2006; De Souza EB și colab., 2006, 2008, 2010).

Pentru aceasta și datorită efectelor adverse ale medicamentelor asupra proprietăților fizice ale dentinei și rezistenței bacteriene, laserul diodă și terapia fotodinamică (PDT) au fost introduse ca instrumente în terapia endodontică pentru a favoriza dezinfectarea sistemului complex al canalelor radiculare. Terapia fotodinamică (PDT) poate viza în mod specific microorganismele fără a deteriora țesuturile gazdă și are ca beneficii acțiunea imediată, accesul la zone complexe, cum ar fi fisuri și furcații, prevenirea bacteriemiei la pacienții imunocompromiși și ameliorarea simptomatologiei.

Terapia fotodinamică antimicrobiană (APDT) este o procedură desfășurată în două etape și presupune aplicarea unui fotosensibilizant, urmată de iradierea cu laser a țesuturilor sensibilizate, ceea ce va genera o reacție fotochimică toxică asupra celulelor țintă, reacție consecutiv căreia vor fi eliminate microorganismele patogene. Fotosensibilizantul are capacitatea de a se acumula selectiv în țesuturi și de a interfera cu substanțele biologice. Acesta este un compus pe bază de cromofori care poate absorbi fotonii din lumina incidentă, producând și eliberând astfel oxigen reactiv și radicali liberi. Albastrul de metilen (AM) și albastrul de toluidină (AT) sunt substanțe fotosensibilizante care au fost studiate pe larg pentru eficacitatea lor pe bacterii planctonice și au fost testate împotriva structurilor biofilmului microbial (Bhavya K și colab., 2022).

Terapia fotodinamică antimicrobiană este o alternativă sigură, eficientă și ușor de implementat, iar spectrul său de activitate acoperă bacterii, ciuperci, virusuri și protozoare, ceea ce îi conferă superioritate față de terapiile convenționale (Wainwright M și colab., 2017). Există studii care raportează efecte antimicrobiene și bactericide ale aplicării laserului oferind astfel o modalitate de tratament promițătoare (Seyedmousavi S și colab., 2014).

**Scopul** cercetării în acest studiu a fost de a explora și evidenția influența iradierii cu laserul diodă cu lungimea de undă de 940 nm (laser cu diodă de mare putere) și efectul terapiei fotodinamice (PDT) asupra viabilității tulpinilor standard de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) și influența laserului cu diodă cu lungime de undă de 940 nm asupra viabilității tulpinilor standard de *Candida albicans* (ATCC 10231) variind condițiile și modalitățile de aplicare a fasciculului laser.

## 5.2 Material și metodă

Testarea influenței laserului cu diodă s-a realizat asupra tulpinilor standard de *Enterococcus faecali* ATCC 29212 și respectiv *Candida albicans* ATCC 10231.

S-a preparat o suspensie de 0,5 standard McFarland în ser fiziologic, care a fost supusă acțiunii fasciculului laser aplicat prin utilizarea laserului cu diode Epic Biolase, cu lungimea de undă 940 nm și o putere maximă de 10W, cu setări determinate în cercetări de laborator. S-au folosit diferite intensități, timpi de contact și vârfuri de aplicare conform programelor presetate ale dispozitivului și anume IP (pungi parodontale infectate), PP (pungi parodontale), AU (ulcer aftos).

Pentru testele efectuate în acest studiu au fost folosite vârfurile E3, E4 și piesa chirurgicală.

După iradiere, din suspensiile folosite s-au realizat diluții seriale din care s-au însămânțat câte 10  $\mu$ L în triplicat și s-a determinat numărul de unități formatoare de colonii per mL (UFC/mL) pentru a determina viabilitatea microorganismelor. Pentru fiecare testare s-au realizat câte 4 și 5 replici.

Pentru a evalua influența volumului suspensiei microbiene de *C. albicans* testate s-a analizat în paralel aceeași suspensie microbială repartizată în recipiente diferite și anume: 900  $\mu$ L repartizat în recipient cu volum final de 1,5mL și respectiv 100  $\mu$ L repartizat în recipient cu volum final de 0,2 mL. Pentru eficacitatea lor în terapia fotodinamică (PDT), datorită prezenței încărcăturii cationice, am utilizat în studiu ca fotosensibilizanți următorii coloranți de fenotiazinium : o soluție de 5mg/ml de albastru de metilen (AM) și una de albastru de toluidină de 1% (AT).

În analiza statistică datele prezentate sunt media  $\pm$  SD (deviația standard) iar graficele au fost realizate cu GraphPad Prism 5.04.

Diferențele dintre valorile determinate s-au analizat folosind testul Mann Whitney. Valorile  $p < 0,05$  au fost considerate semnificative statistic. Nivelurile de semnificație statistică au fost \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ; \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

## 5.3 Rezultate și discuții

Au fost testate suspensii de *E. Faecalis*, folosind laserul diodă 940 nm, cu programul presetat IP (pungi parodontale infectate), pe 3 loturi, diferențele constând în numărul de iradieri, pauza între acestea a fost de 10 secunde, puterea de 2,5 W, modul continuu, cu vârf E3.

Iradierea unei suspensii de *E. faecalis* cu același tip de vârf, E3, însă cu timpi de contact diferiți, prin numărul de iradieri, influențează într-o mică măsură viabilitatea bacteriană.

La următorul lot de testare analiza statistică a unităților formatoare de colonii obținute nu a evidențiat o diferență semnificativă între diferitele iradieri cu vârful E4. Față de primele loturi testate, se constată o eficiență mai mare pentru vârful E3, în aceleași condiții de iradiere, doar cu vârful de aplicare diferit.

Efectele antibacteriene ale laserului la pacienții tratați pentru afecțiuni ale cavității bucale au fost confirmate în cercetări anterioare, unde laserul diodă, folosind modul pulsant, a fost aplicat cu setările de putere peste 2 W, pentru a induce un efect fototermic (de Souza EB și colab., 2008).

În cadrul următorului experiment schimbarea programului de iradiere, de la IP (pungi parodontale infectate), modul continuu (CW) la PP (pungi parodontale), modul pulsant CP2 (intervalul dintre pulsații de 2 milisecunde), cu vârf E4, a determinat o diferență statistică atunci când timpul de iradiere a fost crescut la 15 secunde și am folosit o putere de 3W.

Dezinfecția fotoactivată este recomandată ca procedură adjuvantă pentru eliminarea bacteriilor reziduale din canalul radicular după debridarea endodontică standard. Eficacitatea terapiei fotodinamice (PDT) depinde de microorganism, de tipul de fotosensibilizant și de lumina utilizată. În mod obișnuit sunt folosiți ca fotosensibilizanți albastrul de metilen (AM) și albastrul de toluidină (AT), coloranți de fenotiazinium cu eficacitate în terapia fotodinamică prin încărcătura lor cationică.

Când este expus la lumina cu o anumită lungime de undă, fotosensibilizatorul poate reacționa fie cu oxigenul, fie cu alte biomolecule, pentru a crea radicali liberi, reacții ce vor duce la moartea celulelor; în același timp terapia fotodinamică țintește microorganismele vizate fără daune colaterale asupra celulelor și țesuturilor umane (Usacheva MN și colab., 2001).

Am evaluat efectul antimicrobian al fasciculului laser asupra suspensiei de *E. faecalis* după aplicarea unei substanțe fotosensibilizante respectiv o soluție de albastru de metilen (AM) cu concentrația de 5mg/mL și una de albastru de toluidină (AT) de 1%. Pentru fiecare dintre ele s-au testat două modalități de tratament:

- varianta 1 - o iradiere de 15 sec, putere 3W, modul pulsant CP2, vârf E4
- varianta 2 - biostimulare (biostimulare cu piesa chirurgicală), 180s, putere 4W, energie 720J.

Analiza rezultatelor a arătat că aplicarea parametrilor corespunzători variantei 2 determină scăderea numărului de bacterii.

Aplicarea unei substanțe fotosensibilizante mărește efectul inhibitor al fasciculului laser, însă s-a observat că în cazul albastrului de toluidină numărul de UFC este mai scăzut comparativ cu albastrul de metilen.

Considerând efectul pozitiv al terapiei fotodinamice asupra viabilității *E. faecalis* în care am folosit ca fotosensibilizant albastrul de toluidină, am testat efectul laserului diodă 940 nm în prezența adiferite volume, respectiv 1/100 și 1/10, de albastru de toluidină cu concentrația de 5mg/mL, folosind aceeași parametri de iradiere: biostimulare, putere 4W, energie 720J, timp de 180s.

Evaluarea rezultatelor obținute a arătat că un volum mai mare, o proporție de 1/10 de fotosensibilizator albastru de toluidină duce la o scădere a numărului de bacterii viabile.

Cu următoarele loturi de studiu am experimentat aplicarea unui fascicul laser cu intensități de putere diferite. Suspensia de *E. faecalis* după un contact de 3 minute la temperatura camerei cu soluția de albastru de toluidină (5mg/mL) în proporție de 1/100 (1/100=10 microL) a fost iradiată cu următorii parametri: I1, I2, I3 cu o iradiere de 30 secunde, modul pulsat CP2, programul IP, vârf E4, modificând puterea cu 2W, 3W și 4W și am observat că o putere de 3 și respectiv 4W determină scăderea numărului de bacterii viabile.

Am realizat teste asupra acțiunii laserului aplicând același timp de contact, însă puteri și vârfuri diferite și am constatat că vârful E3 este mai eficient comparativ cu E4 în cazul unei testări timp de 30 secunde cu puterea de 5W, modul pulsat CP2, program presetat IP (infected pockets), după aplicarea unei soluții de albastru de toluidină (1/100=10 microL) cu concentrația de 5mg/mL.

Efectul inhibitor al laserului în prezența unui fotosensibilizant (albastru de toluidină) este influențat de timpul de acțiune. Astfel, utilizarea aceluiași tip de vârf, de program și intensitate, dar cu modificarea timpului de contact a evidențiat faptul că un contact mai îndelungat determină scăderea numărului de celule viabile.

Tulpinile de Candida se găsesc ocazional în infecția primară a canalelor radiculare, dar apar mai frecvent la dinții obturați, cu leziuni refractare la tratament. Candida albicans este cea mai răspândită specie fungică, un microorganism care are afinitate pentru dentină și este rezistentă la unele medicamente aplicate în canalele radiculare, de exemplu, cele pe bază de hidroxid de calciu.

Creșterea cazurilor de infecție cauzată de tulpinile de Candida și în consecință utilizarea excesivă a tratamentelor medicamentoase antimicrobiene, a favorizat în ultimele decenii apariția rezistenței acestor specii la agenții antifungici convenționali. Studiul metodelor suplimentare pentru controlul acestor microorganisme, cum ar fi iradierea cu laser și terapia fotodinamică, devine esențial.

Astfel, am analizat in vitro efectul fasciculului laser cu lungimea de undă 940 nm asupra tulpinii standard de *C. albicans* ATCC 10231.

S-au realizat o serie de loturi de lucru, variind parametrii laserului cu diodă utilizat prin modificarea puterii (2W,3,5W, 5,5W) și a vârfului de aplicare a fasciculului laser (E3,E4), folosind programul presetat ulcer aftos (AU).

Într-o primă testare rezultatele obținute au arătat că în cazul variantelor 3 și 1, în care s-au folosit puteri de 2W și 5,5W, cu vârful E4 și E3 se observă o scădere a numărului de celule viabile comparativ cu controlul, respectiv o scădere mai mare a viabilității microbiene la o putere de 5,5 W, cu vârful E3.

Utilizând același program presetat AU (ulcer aftos) dar variind intensitatea puterii, numărul de iradieri și tipul de vârful, determinarea numărului de UFC/mL a arătat că dintre variantele testate, V5 și V6, inhibă dezvoltarea microbiană, cu eficiență mai bună pentru o putere de 6,5W, folosind vârful neinițiat (V5:6,5 W, 2 iradieri a 20 sec cu pauză 10 sec între ele, program AU).

În cadrul analizelor s-a testat și eficiența unei iradieri într-o singură etapă (o singură iradiere), timp de 30 secunde cu același tip de vârf, însă modificând intensitatea puterii.

Dintre variantele testate, s-a observat că aplicarea laserului la o putere de 4,5W în varianta 9 determină o reducere semnificativă a viabilității *C. albicans* din punct de vedere statistic.

Pentru a evalua influența volumului suspensiei microbiene testate s-a analizat în paralel aceeași suspensie microbiană repartizată în recipiente diferite și anume 900  $\mu$ L repartizat în recipient cu volum final de 1,5 mL și respectiv 100  $\mu$ L repartizat în recipient cu volum final de 0,2 mL, având în vedere că în canalul radicular spațiul de lucru este restrâns, iar spațiul de iradiat este limitat.

Testarea unor volume diferite cu aceiași parametri nu a evidențiat diferențe semnificative statistic în ceea ce privește reducerea încărcăturii microbiene.

## **Discuții**

Rezultatele obținute în cadrul studiului efectuat, în sensul eficienței mai scăzute în reducerea completă a viabilității microbiene prin folosirea exclusivă a laserului sunt concordante cu studii publicate de către Moshonov și colab., în care iradierea laser Nd: YAG a fost comparată cu eficiența NaOCl în dezinfectarea sistemului canalului radicular. Autorii constată că iradierea cu laser Nd:YAG a redus semnificativ numărul de bacterii, în timp ce și irigarea cu NaOCl a dezinfectat eficient canalele radiculare.

Asemănător cu rezultatele studiului nostru, Jha D și colab., (2006) au demonstrat incapacitatea instrumentelor laser și rotative de a realiza singure dezinfecția completă a canalelor radiculare.

Christo JE și colab., (2016) evidențiază în același sens faptul că soluțiile de NaOCl și iradierea cu laser Er:YAG au fost eficiente împotriva tuturor microorganismelor, tratamentul cu NaOCl fiind statistic superior tratamentului cu laser.

Au fost examinate diverse sisteme laser în vederea folosirii ca adjuvanți la metodele de dezinfecție utilizate în prezent în tratamentul canalului radicular pentru a crește eficacitatea NaOCl în curățarea sistemului de canale inclusiv în canalele laterale (Christo JE și colab., 2016). Autorii au folosit diodele de 810 nm cu setarea puterii la ieșire de 2,5W și 5 secunde per ciclu și cu o repetare a ciclului de 4 ori



la un interval de 2secunde. Dezinfecția cu diode a canalelor radiculare contaminate experimental cu *Enterococcus faecalis* a fost comparată cu dezinfecția cu hipoclorit de sodiu, clorhexidină și combinația de diode cu clorhexidină 2%. Diodele, ca dezinfectant de canale și combinația de diode cu soluție de clorhexidină 2%, au prezentat cel mai mare nivel de eficacitate antimicrobiană împotriva *Enterococcus faecalis* (Olivi G și colab., 2011, 2013).

Datele pot fi considerate în concordanță cu studiul personal având în vedere diferențele de lungime de undă ale laserului folosit ca și diferitele setări aplicate la testare.

Rezultate similare studiului nostru au fost comunicate consecutiv experimentelor efectuate de Kreisler M (2003) care a investigat efectul bactericid al unui laser semiconductor utilizat în combinație cu irigarea cu NaOCl/peroxid de hidrogen (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) sau numai cu soluție salină și a constatat că numai utilizarea laserului nu a dus la o reducere bactericidă semnificativă în comparație cu utilizarea acestuia împreună cu soluții de irigare.

În parametrii studiului efectuat de Preethee T și colab., (2012), s-a concluzionat că dioda de 908 nm utilizată împreună cu tehnicile chimico-mecanice convenționale a demonstrat o eliminare semnificativă a *E. faecalis* în treimea apicală a dentinei canalului radicular. Analiza unidirecțională a variației a arătat diferențe semnificative statistic între grupurile iradiate cu laser, grupurile neiradiate și grupul de control subliniind eficiența laserului în activarea soluțiilor de irigare și mai puțin ca efect singular asupra *E. Faecalis*, în concordanță cu rezultatele obținute în cercetarea personală, subliniind astfel că eficiența laserului trebuie susținută prin folosirea soluțiilor de irigare.

Udart și colab., (2011) au testat efectul bactericid al lungimii de undă de 940 nm asupra biofilmului de *E. faecalis*. În studiul său a constatat că această lungime de undă prezintă un efect antibacterian foarte slab asupra biofilmului bacterian și a concluzionat că efectul bactericid al laserului de 940 nm provine din efectul său termic și pentru ca acest efect să fie suficient de puternic pentru a dezinfecta canalul radicular ar trebui ca laserul să fie aplicat la o putere suficient de mare, temperatura în dentina canalului radicular să se ridice la aproximativ 70°C situație în care ar putea distruge țesuturile parodontale, creșterea eficienței asupra viabilității microbiene fiind evidențiată în cercetarea personală odată cu creșterea intensității puterii.

S-au realizat studii pentru a stabili eficiența laserului diodă 940 nm asupra eliminării stratului de frotiu folosind diverse caracteristici de setare, astfel Maden M și colab., (2013), arată că prin utilizarea a 13 cicluri de 10 secunde de expunere asociate cu lavaj cu EDTA 15%, urmat de NaOCl 2,5%, se obțin rezultatele cele mai bune în timp ce un studiu a lui Schlafer și colab., (2010), arată că la o expunere fotoactivată de 30 de secunde, se produce reducerea numărului de agenți patogeni viabili din canalele radiculare.

În cercetarea efectuată în cadrul studiului personal am constatat reducerea numărului de unități formatoare de colonii consecutiv măririi numărului de iradieri și a timpului de expunere.

Alfredo E și colab., în 2008, au evaluat creșterea temperaturii după iradiere în interiorul canalului cu laser de 980 nm diodă timp de 30 de secunde, cu setări diferite de putere (1.5 W, 3.0 W, 5.0 W), în condițiile de umiditate și uscare a canalului analizat în treimea cervicală, medie și apicală. Autorii au ajuns la concluzia că aplicarea a 1.5 W și 3.0 W, timp de 20 de secunde, reprezintă o modalitate terapeutică sigură în terapia endodontică.

Da Fonseca A. și colab., în 2012, a evaluat modificarea temperaturii la incisivii mandibulari utilizând dioda laser 810 nm, la setări diferite de putere (1.5W, 2.0W, 2.5W, 3.5W, 3.0 W). Autorii au raportat că doar la 3.5 W s-a produs o creștere a temperaturii cu mai mult de 7 grade (valoare critică asumată în cadrul studiului). Ei au recomandat folosirea laserului la o putere mai mică decât 3W pentru tratamentul endodontic.

În concordanță cu recomandările din literatura de specialitate valorile puterilor folosite pentru cercetarea personală care au evidențiat o scădere a viabilității microbiene au fost de 3W, timp de 15 secunde pentru ambele tulpini bacteriene testate.

Hmud și colab. (2010) confirmă posibilitatea utilizării laserelor cu infraroșu (940 nm și 980 nm), pentru a activa acțiunea iriganților în tratamentul endodontic, folosind o putere de 4 W la 10 Hz și respectiv, 2,5 W la 25 Hz. Autorii atrag atenția asupra lipsei de afinitate între aceste lungimi de undă și apă (TilakchandM și colab., 2018; Kuzekanani M și colab., 2019; Constanza M și colab., 2020).

Având în vedere că scopul final al terapiei de canal este eliminarea cât mai multor bacterii din canalul radicular, s-au efectuat studii (Hendi SS și colab., 2021) care au avut ca scop compararea efectelor antibacteriene ale unui laser cu diodă cu o lungime de undă de 940 nm și nanoparticule de argint și efectele sinergice ale ambelor tehnici asupra *Enterococcus faecalis*.

Deși laserul cu diodă a arătat o diferență semnificativă în numărul de colonii de bacterii înainte și după intervenție, acesta singur nu a fost suficient de eficient pentru a elimina bacteriile. Utilizarea simultană a acestora cu laserul cu diodă a arătat că iradierea cu laser nu poate crește efectul antibacterian al nanoparticulelor de argint. În cele din urmă, hipocloritul de sodiu este încă standardul de aur în dezinfecția canalului radicular (Hendi SS și colab., 2021).

Astfel laserul cu diodă poate fi considerat o tehnică alternativă pentru dezinfecția canalului radicular iar combinația de hipoclorit de sodiu și lumina laserului cu diodă (940 nm) are un efect sinergic, intensificând acțiunea bactericidă (de Souza EB și colab., 2008; Castelo-Baz P și colab., 2012).

Mustafa M B și colab., (2020), au efectuat un studiu in vitro pentru a testa și evalua efectul bactericid al laserului diodă 940 nm. În acest studiu a fost testat efectul antibacterian al laserului și al

NaOCl 5,25% separat și combinat. Radiația laser provenită de la un laser diodă cu lungimea de undă de 940 nm la o putere de 1,3 W a arătat un efect antibacterian mic asupra biofilmului bacterian atunci când este utilizat fără NaOCl, date ce concordă cu rezultatele obținute de noi prin aplicarea fasciculului laser chiar la o putere mai mare de 2,5 W. În concluzie, iradierea cu laserul cu diodă de 940 nm are un efect antibacterian redus asupra *E. faecalis* deoarece energia fonică este slab absorbită de bacteriile gram pozitive (Udart M și colab., 2011).

Din aceste studii putem desprinde concluzia că este dificil de comparat rezultatele datorită diferențelor de lungime de undă și a setărilor diferite, dar utilizarea laserilor cu diode prezintă interes datorită dimensiunilor sale mici, costului redus și aportului important pe care îl aduc pentru sterilizarea canalelor radiculare.

Terapia fotodinamică este considerată un supliment la protocoalele tradiționale de dezinfecție a canalelor și poate fi combinată cu tehnicile obișnuite de instrumentare mecanică și terapie chimică antimicrobiană (Hamblin MR și colab., 2004).

Garcez și colab., (2008, 2010, 2011), au comparat eficacitatea terapiei fotodinamice antimicrobiene, terapia standard de canal și tratamentul combinat pentru eliminarea bacteriilor prezente în canalele infectate și au arătat că terapia de canal a redus bacteriile cu 90%, numai terapia fotodinamică antimicrobiană a redus 95% din bacterii iar combinația celor două proceduri a produs o reducere cu 98% mai mult, aspect demonstrat în cercetarea personală prin creșterea efectului inhibitor al fasciculului laser în prezența celor două tipuri de fotosensibilizator.

Terapia fotodinamică are mai multe avantaje față de antibiotic deoarece oferă o direcționare precisă, și are triplă specificitate locală prin: (1) asocierea/absorbția preponderentă a fotosensibilizanților de către celulele țintă în comparație cu celulele nețintă, (2) inerția farmacodinamică a substanțelor fotosensibilizante neiradiate, precum și (3) iradierea limitată la aria zonei infectate (Garcez și colab., 2010).

În consecință, toxicitatea sistemică este în mare măsură absentă în afara zonei iradiate, zonă plină de fotosensibilizant. În comparație cu antibioticele, nu se dezvoltă rezistență împotriva terapiei fotodinamice și a fotosensibilizanților, iar tratamentul repetat folosind această tehnică nu a condus la selectarea tulpinilor rezistente (Mohammadi Z și colab., 2017).

Aceste motive stau la baza utilizării potențiale a terapiei fotodinamice în combaterea tulpinilor rezistente într-un mod minim invaziv și prietenos cu pacientul.

Meire și colab., (2009), au comparat eficacitatea antimicrobiană a 2 lasere de mare putere (Er:YAG și Nd:YAG) cu cea a acțiunii NaOCl asupra *Enterococcus faecalis*. Utilizarea ambelor sisteme a dus la o reducere slabă a numărului de bacterii.

Potrivit lui George și Kishen (2007, 2008), referitor la *Enterococcus faecalis*, APDT poate distruge integritatea funcțională a pereților celulelor bacteriene, ADN-ul și proteinele membranei celulare. Volumul daunelor asupra acestor ținte este influențat de fotosensibilizatorul utilizat în timpul APDT.

Astfel, conform rezultatelor noastre, albastrul de toluidină a arătat un efect fotodinamic antimicrobian mai mare pentru *E.faecalis* decât albastrul de metilen și un efect mai mare la un volum crescut, de 1/10 de albastru de toluidină. Folosirea unor puteri ale laserului de 3 și 4 W au dus la scăderea numărului de unități formatoare de colonii, iar folosirea unei puteri de 5W, în modul pulsat CP2 timp de 30 secunde, în prezența albastrului de toluidină, a fost cea mai eficientă pentru scăderea numărului de bacterii viabile. Timpul mai îndelungat de aplicare crește eficiența și în același sens la același timp de iradiere, numărul iradierilor influențează scăderea viabilității microbiene.

Având în vedere că nu toți fotosensibilizatorii au același efect fotodinamic împotriva diferitelor microorganisme, Soria-Lozano P și colab., (2015), au comparat in vitro efectul fotodinamic al albastrului de metilen (MB), al trandafirului Bengal (RB) și al curcuminei (CUR) în combinație cu lumina albă, asupra microorganismelor *S. mutans*, *S. sanguis* și *C. albicans*. Aceștia au concluzionat că eficacitatea terapiei fotodinamice depinde de microorganism, fotosensibilizator și lumina utilizată, astfel, trandafirul Bengal a arătat un efect fotodinamic antimicrobian mai mare pentru speciile de *Streptococcus*, în timp ce albastrul de metilen a fost mai eficient pentru speciile de *Candida*. Cu toate acestea, în studiul nostru nu s-au observat efecte antimicrobiene atunci când tulpinile au fost expuse separat la sursa de lumină.

Studiile privind eficacitatea fotobactericidă a albastrului de metilen și albastrului de toluidină au arătat rezultate inconstante în literatură.

În mare parte, o activitate bactericidă mai mare a albastrului de toluidină este în concordanță cu rezultatele obținute în cercetarea proprie.

Scopul studiului lui Eslami LM și colab., (2019), a fost de a compara efectele antimicrobiene ale hidroxidului de calciu, pastei de antibiotice triple, a terapiei fotodinamice în prezența albastrului de toluidină, diodei emițătoare de lumină și laserului cu diodă 940 nm pe biofilmul de *Enterococcus faecalis* și *Candida albicans* din sistemul de canal radicular al dinților umani ex-vivo. Consecutiv studiului au constatat că tratamentul cu pasta cu antibiotice, terapia fotodinamică și LED reduc grosimea biofilmului în comparație cu grupul martor și cu alte grupuri experimentale. Deoarece terapia fotodinamică este un tratament într-o singură vizită și nu provoacă rezistență microbială, este metoda preferată și în comparație cu laserul beneficiază de mai multe avantaje, cum ar fi: mai multă eficacitate datorită spectrului mai larg, fezabilitate, siguranță și accesibilitate, rezultate concordante cu reducerea viabilității microbiene obținute în studiul nostru în prezența albastrului de toluidină sub influența timpului de acțiune, a puterii și a numărului de iradieri.

Souza RC și colab., (2010), au evaluat efectele specifice ale terapiei fotodinamice folosind albastru de metilen, albastru de toluidină și verde de malachit ca fotosensibilizatori și numai iradierea cu laser cu putere redusă asupra viabilității *C. albicans* concluzionând reducerea numărului de unități formatoare de colonii de *C. albicans*. Aceste rezultate precum și cele comunicate de Souza SC și colab.(2006), Giroldo LM și colab., (2009), sunt în acord cu cele ale studiului realizat în cadrul acestei cercetări, respectiv că aplicarea laserului diodă 940 nm la o putere de 4,5 W determină o reducere semnificativă din punct de vedere statistic a viabilității *C. albicans*.

Wilson și Mia (1993) au studiat fotosensibilizarea speciilor de *Candida* consecutiv utilizării albastrului de toluidină și luminii generate de laserul heliu–neon (He-Ne) (632,8 nm și 66,36 J/cm<sup>2</sup>) și au constatat o reducere a numărului de UFC/ml de 77% pentru *C.albicans*. Și studiul efectuat în cadrul cercetării personale a evidențiat o eficiență crescută după aplicarea laserului odată cu modificarea numărului de iradieri, a timpului de aplicare și a vârfurilor aplicatoare care influențează prin diametrul fibrei și intensitatea puterii la vârf, respectiv când s-a folosit o putere de 6,5 W și vârful E4 neinițiat al laserului diodă cu lungimea de undă 940 nm.

Studii efectuate de Usacheva și colab., (2001), au evaluat eficacitatea bactericidă și au evidențiat că reducerea numărului de UFC/ml de *C. albicans* s-a intensificat cu creșterea densității de energie a laserului aplicat, de la 15,8 J/cm<sup>2</sup> la 39,5 J/cm<sup>2</sup> ceea ce concordă și cu rezultatele studiului meu.

Maver-Biscanin și colab., (2005), au demonstrat efectul fungicid al luminii laser de putere redusă în absența unui fotosensibilizant.

În studiul nostru, o reducere semnificativă din punct de vedere statistic a UFC/ml s-a înregistrat la o iradiere timp de 30 secunde cu o putere de 4,5 W.

Seyedmousavi și colab., (2014), au observat că folosind energii de 10 J, la lungimi de undă de 685 și 830 nm se produc efecte semnificative statistic, in vitro, asupra patogenității *C.albicans* (valoarea  $p \leq 0,05$ ). La rândul lor, Maver-Biscanin și colab., (2005), în studiul lor in vivo și in vitro pentru reducerea speciilor de *C. albicans*, au realizat iradieri ale zonelor de tratat cu timpi de expunere diferiți, 5 min (830 nm, 3,0 J/cm<sup>2</sup>, 60 mW) și 10 min (685 nm, 3,0 J/cm<sup>2</sup>, 30 mW). În contrast cu studiile menționate mai sus o reducere semnificativă statistic a numărului de UFC/ml de *C. albicans*, in vitro, am găsit aplicând două iradieri, cu timp de expunere 20 secunde, pauză 10 secunde între iradieri și o putere 5,5 W dar și aplicând o singură iradiere, timp de 30 secunde, cu puterea de 4,5 W.

Datele prezente sugerează că lumina laser la anumite lungimi de undă ar putea avea unele efecte pozitive asupra reducerii infecției cu *C. albicans*; cu toate acestea este evidentă necesitatea aprofundării cercetării și efectuarea unor studii clinice.

Divergențele dintre studiul nostru și rezultatele raportate în literatura de specialitate s-ar putea datora lipsei de protocoale, de parametri predefiniți pentru utilizarea terapiei cu laser și terapiei fotodinamice, fapt care afectează fiabilitatea comparației între rezultatele obținute în diferite studii. În plus, concentrația, starea fiziologică a microorganismelor, timpul de incubație și tipul de fotosensibilizant, precum și timpul de expunere, numărul de iradieri, puterea și densitatea energiei, alături de caracteristicile legate de programele presetate ale laserului folosit, pot influența rezultatele terapiei endodontice ce folosește adjuvant numai aplicarea tehnologiei laser sau a terapiei fotodinamice.

#### **5.4 Concluzii**

Iradieră suspensiei microbiene cu laserul diodă a evidențiat faptul că timpul de contact prin numărul de iradieri influențează în mică măsură viabilitatea microbiană în timp ce în aceleași condiții de iradiere vârful de aplicare folosit, respectiv E3 a avut o eficiență mai mare comparativ cu vârful E4.

La un timp de iradiere crescut la 15 secunde, cu o intensitate a puterii de 3 W și mod de aplicare pulsant (CP2) s-au evidențiat diferențe semnificative statistic în reducerea numărului de bacterii viabile.

Deși laserul cu diodă a arătat o reducere semnificativă în numărul de colonii de bacterii după aplicare, chiar după mărirea timpului și puterii aplicate, acesta singur nu a fost suficient de eficient pentru a elimina în totalitate tulpinile bacteriene folosite în studiile efectuate respectiv *E. faecalis* și *C. albicans*.

Așa cum am mai precizat eficacitatea terapiei fotodinamice depinde de microorganism, de fotosensibilizant și de caracteristicile și parametrii laserului utilizat. Conform rezultatelor noastre, albastrul de toluidină a arătat un efect fotodinamic antimicrobian mai mare pentru *E. faecalis* decât albastrul de metilen și un efect mai mare la un volum crescut, respectiv atunci când am folosit o proporție mai mare, de 1/10 de albastru de toluidină. În prezența albastrului de toluidină, folosirea unor puteri ale laserului de 3 și 4 W au dus la scăderea numărului de unități formatoare de colonii. În aceleași condiții de iradiere, respectiv timp de 30 secunde, la o putere de 5 W în modul pulsant CP2 folosirea vârfului E3 a fost cea mai eficientă pentru scăderea numărului de bacterii viabile. De asemenea, s-a evidențiat că în prezența albastrului de toluidină, folosind aceleași condiții de iradiere, timpul mai îndelungat de aplicare crește eficiența și în același sens la același timp de iradiere, numărul iradierilor influențează pozitiv scăderea viabilității microbiene.

Se poate concluziona că în ceea ce privește viabilitatea *C. albicans* aceleași condiții de timp de aplicare a fasciculului laser, număr de iradieri, folosind același vârf, numai modificarea puterii și respectiv lotul în care s-a folosit o intensitate a puterii de 4,5 W a determinat o reducere a viabilității microbiene. Scăderea viabilității *C. albicans* s-a obținut și atunci când prin variații ale puterii s-a evidențiat varianta în care s-a folosit o putere mai mare, de 5,5 W cu vârful E3.

În variantele în care s-au modificat puterea și tipul de vârf folosit am obținut scăderi semnificative statistic ale numărului de unități formatoare de colonii la puteri de 6,5 W și 7,5 W însă eficiența mai crescută a fost la puterea de 6,5 W când s-a folosit vârful neinițiat.

Testarea unor volume diferite cu aceiași parametri ai laserului nu a evidențiat diferențe semnificative statistic în ceea ce privește reducerea încărcăturii microbiene.

## **CAPITOLUL 6. STUDIU PRIVIND EVALUAREA POTENȚĂRII EFECTULUI ANTIMICROBIAN (CALITATIV ȘI CANTITATIV) AL UNOR PRODUSE NATURALE, FOLOSITE CA ADJUVANT ÎN TERAPIA ENDODONTICĂ, PRIN IRADIAREA ACESTORA CU UN FASCICUL AL LASERULUI DIODĂ 940 NM**

### **6.1 Introducere**

Obiectivul esențial pentru reușita tratamentului endodontic este curățarea temeinică a sistemului canalului radicular, prin îndepărtarea țesutului pulpar infectat, a bacteriilor prezente și a resturilor de dentină contaminată înainte de a-l sigila, împreună cu dezinfectarea dentinei profunde și a rețelei tubulare pentru a preveni infecția și a favoriza vindecarea pe termen lung.

Procedura endodontică nechirurgicală se bazează pe instrumentare biomecanică, irigarea canalelor și tratament medicamentos pentru dezinfectarea sistemului de canale radiculare. Diferite tehnici de instrumentare și-au dovedit eficacitatea lor în scăderea încărcăturii bacteriene fără a reuși eradicarea totală a acestora. Iriganții intracanalari, cum ar fi NaOCl, necesită contact direct de-a lungul suprafeței dentinei pentru a-și exercita efectul bactericid. De asemenea, din cauza tensiunii superficiale, aceste soluții nu reușesc să pătrundă dentina la adâncime suficientă, comparativ cu capacitatea microorganismelor patogene de a pătrunde în dentină (Gomes-Filho J și colab., 2008).

În același timp, anatomia complexă a sistemului canalului radicular permite bacteriilor să supraviețuiască condițiilor dure.

Dintre microorganismele implicate în eșecul tratamentului endodontic ce pot fi cultivate din canalele radiculare care sunt supuse retratării, cel mai frecvent întâlnit este *Enterococcus faecalis*, o bacterie gram pozitivă, asemănătoare cu streptococii, care are capacitatea de a forma biofilme intra și extraradicular, biofilme ce protejează parțial aceste bacterii de apărarea autoimună, de proceduri endodontice și de medicamente, făcându-le rezistente la fagocitoză, anticorpi și agenți antimicrobieni. *E. faecalis* are diferite mecanisme care îi permit supraviețuirea în medii nefavorabile, de exemplu, capacitatea de a se dezvolta la un pH alcalin, salinitate ridicată, rezistent la temperaturi cuprinse între 10° - 60°C. Această bacterie poate supraviețui în prezența iriganților și a soluțiilor folosite în

tratatea canalelor, motiv pentru care crește interesul pentru produse alternative eficiente și economice ca și opțiuni de tratament pentru afecțiunile orale.

Extractele vegetale și produsele pe bază de plante sunt alternative promițătoare pentru substanțele chimice de sinteză folosite ca soluții de irigare a canalelor radiculare. Utilizarea alternativelor pe bază de plante pentru tratamentul canalului radicular devine din ce în ce mai populară datorită proprietăților benefice, disponibilității și lipsei efectelor secundare, duratei prelungite de depozitare, rentabilității, toxicității minime și lipsei rezistenței microbiene înregistrate până acum, (Arora S și colab., 2021).

Tehnologia laser, folosită împreună cu soluțiile de irigare clasice și cu cele pe bază de extracte naturale, îmbunătățește capacitatea de curățare, îndepărtarea resturilor și a stratului de frotiu din canalele radiculare, eficientizând astfel decontaminarea sistemului endodontic.

Utilizarea laserului diodă cu lungimea de undă cuprinsă între 810 și 940 nm a devenit din ce în ce mai frecventă în terapia combinată constând în irigare cu soluții și iradiere cu laserul diodă 940 nm, precum și activarea soluțiilor cu laser, opțiune de tratament eficientă pentru reducerea *E. faecalis* precum și a altor flore bacteriene din sistemul de canal radicular.

Pornind de la aceste observații **scopul** acestui studiu a constat în evaluarea in vitro, calitativă și cantitativă a activității antimicrobiene și a influenței asupra dezvoltării de biofilme microbiene, a 7 extracte vegetale alcoolice și hidroalcoolice (din nuc, salvie și echinacea), înainte și după expunerea la acțiunea unor fascicule laser emise de laserul diodă cu lungimea de undă 940 nm, la 2 variante ale puterii la ieșire la vârful fibrei, de 3 W și respectiv 5 W din perspectiva eficienței în tratamentul endodontic, durata de viață a dintelui depinzând în mare măsură de corectitudinea și eficiența tratamentului.

## 6.2 Material și metodă

Din nuc (*Juglans regia*) s-au folosit fructele și s-au realizat 4 extracte alcoolice și hidroalcoolice în metanol (metanol 100 % și apă:metanol 1:1 v/v, peste care s-au pus 5 g plantă) și 4 extracte alcoolice și hidroalcoolice în etanol (etanol 100% și apă:etanol 1:1 v/v peste care s-a pus 1g plantă) din următoarele componente: *pericarp și mezocarp* (coaja verde a nucii), *endocarp* (partea lemnoasă a nucii), *tegumentul seminal* (tegumentul care acoperă sămânța), *pereții lemnoși* din interiorul seminței ce separă cotiledoanele și lobi. Fragmentele de coajă verde au fost liofilizate înainte de a fi utilizate.

Pentru obținerea extractelor din fructele de nuc a fost folosită extracția prin microunde cu extractor Ethos Start D (1 oră la 100°C).

Din salvie (*Salvia officinalis*) s-a realizat un extract hidroalcoolic în etanol din frunza de salvie (*Salvia officinalis herba*) (extract 1:5, raport alcool etilic 96%:apa = 35:65).



Extractul hidroalcoolic în etanol din frunza de salvie (*Salvia officinalis herba herba*) s-a realizat astfel: frunzele de salvie (*Salvia officinalis herba*) au fost curățate de impurități, spălate și lăsate să se usuce la temperatura camerei, apoi mărunțite cu o moară de laborator și amestecate cu soluția hidroetanolică (extract 1:5, raport alcool etilic 96%:apa = 35:65).

Extracția s-a realizat prin microunde cu extractor Ethos Start D (1 oră la 100<sup>0</sup> C). Extractele obținute au fost uscate la rotavapor, iar produsul rezultat a fost reluat în DMSO (dimetilsulfoxid) la o concentrație finală 20 mg/mL.

Din părțile supraterane ale echinaceei (*Echinacea purpurea*), s-a folosit pentru testare în studiile efectuate tinctura de echinacea gata preparată. Tinctura de Echinacea conține *E. purpurea* 20 g și alcool etilic 70% v/v pentru 100 g soluție.

Din extractele de plante preparate s-au ales pentru testare următoarele probe cu codificările aferente:

N<sub>5</sub> – extract în metanol din pericarp și mezocarp liofilizate de *Juglans regia*

N<sub>7</sub> – extract în etanol din endocarp de *Juglans regia*

N<sub>11</sub> – extract în metanol din tegument seminal de *Juglans regia*

N<sub>19</sub> – extract în apă:metanol din pericarp și mezocarp de *Juglans regia*

N<sub>20</sub> – extract în apă:metanol din interiorul seminței ce separă cotiledoanele și lobiile de *Juglans regia*

S – extract în apă:alcool etilic din *Salvia officinalis*

E – tinctură de Echinacea

3W – extractul de testat tratat cu fascicul laser 3W

5W – extractul de testat tratat cu fascicul laser 5W

Cele 7 extracte netratate reprezintă martorul (control), iar variantele analizate s-au obținut prin tratarea extractelor vegetale cu un fascicul al laserului cu diodă cu lungimea de undă de 940 nm, în modul pulsant (CP2), cu puteri ale fasciculului laser la ieșire de 3 W și respectiv 5 W.

Aceeași soluție stoc din fiecare extract a fost utilizată în toate determinările efectuate.

Tulpina bacteriană utilizată în acest studiu a fost *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (American Type Culture Collection) care a fost însămânțată pe mediu Mueller Hinton agar și TSB (triptone soy broth) la 37<sup>0</sup> C.

Pentru a se determina efectul potențator al laserului cu diodă, o parte din cantitatea obținută din cele 7 extracte a fost tratată cu un fascicul al laserului cu diodă cu lungimea de undă de 940 nm, în modul pulsant, cu puteri ale fasciculului laser la ieșirea prin fibra optică de 3 W și respectiv 5 W.

Din fiecare extract de plante ales pentru testare plus tulpina bacteriană s-au pregătit câte 3 eprubete: control, lot iradiat cu fascicul laser cu puterea 3W, lot iradiat cu fascicul laser cu puterea 5W.

Am realizat iradierea folosind vârful E4, neinițiat, timp de 30 secunde și programul presetat Infected Pockets, în modul pulsant CP2 (Comfort Pulse), cu durata pulsului de 1milisecundă.

Tehnica de lucru pentru activarea extractelor pregătite a constat în introducerea vârfului vertical în eprubete, cu mișcări circulare executate ușor, de jos în sus, pe întreaga lungime a eprubetei.

*Evaluarea calitativă a activității antimicrobiene* s-a efectuat prin metoda Kirby-Bauer adaptată. O suspensie bacteriană ajustată la densitatea de  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL (Unități Formatoare de Colonii), a fost însămânțată în pânză pe plăci cu mediu Mueller Hinton agar. Extractele testate au fost depuse în spot-uri de 10  $\mu$ L. După însămânțare, plăcile au fost lăsate în repaus la temperatura camerei pentru adsorbția picăturii de soluție în mediu, după care au fost incubate la termostat (37° C), timp de 24 de ore. Efectul antibacterian a fost cuantificat prin apariția unui halou de inhibiție (o zonă clară) în jurul spotului care a fost măsurat cu ajutorul unei rigle.

*Determinarea cantitativă a activității antimicrobiene* a extractelor analizate s-a realizat prin metoda microdiluțiilor seriale în mediu lichid (Mueller Hinton), în vederea determinării concentrației minime inhibitorii (CMI), adică a cantității minime de compus testat capabilă să inhibe creșterea celulelor microbiene.

În acest scop, s-au utilizat plăci cu 96 de godeuri în care s-au realizat diluții seriale binare ale extractelor. În primul godeu s-au pipetat 90  $\mu$ l mediu de cultură lichid și 90  $\mu$ l extract. Din acesta s-au transferat 90  $\mu$ l în cel de-al doilea godeu, iar din al doilea godeu s-au transferat 90  $\mu$ l în al treilea și așa mai departe până la ultimul godeu, din care s-au aruncat 90  $\mu$ l.

Ulterior, godeurile au fost însămânțate cu câte 10  $\mu$ l suspensie microbiană cu densitate  $10^6$  UFC/mL. La fiecare testare s-a lucrat și cu un martor de cultură microbiană (un șir de godeuri conținând respectiv mediu de cultură inoculat cu suspensie microbiană) și un martor de sterilitate a mediului (control negativ).

După incubarea plăcilor la 37° C timp de 24 de ore, au fost analizate rezultatele obținute prin examinare macroscopică.

În godeul martor de creștere mediul a fost tulbure ca urmare a creșterii microbiene. Godeul martor de sterilitate obligatoriu nu a prezentat nici o creștere bacteriană aspectul lichidului rămânând clar, transparent.

Concentrația de extract corespunzătoare ultimului godeu în care s-a mai observat, respectiv dezvoltarea culturii, a reprezentat CMI pentru compusul respectiv.

*Evaluarea activității microbicide* a extractelor s-a realizat prin însămânțarea unui volum de 10  $\mu$ L din godeurile utilizate pentru determinarea CMI în vederea determinării concentrației minime bactericide (CMB) exprimată ca cea mai mică concentrație la care extractul testat a manifestat efect letal asupra bacteriilor.

*Studiul influenței compușilor testați asupra dezvoltării de biofilme microbiene* pe substrat inert s-a realizat în plăci cu 96 de godeuri cu fundul plat în care diluții binare ale extractelor au fost puse în contact cu un inocul bacterian având densitatea de  $10^6$  UFC/mL.

După incubarea la 37° C timp de 24 ore plăcile au fost golite și spălate de trei ori cu apă fiziologic sterilă pentru a îndepărta bacteriile care nu au aderat la pereții godeurilor.

Bacteriile aderate la materialul plăcilor au fost fixate timp de 5 minute cu metanol apoi au fost colorate cu soluție alcalină de cristal violet 1% timp de 15 minute.

Soluția de colorare s-a îndepărtat, iar plăcile au fost spălate sub jet de apă de la robinet.

După uscare la temperatura camerei, biofilmele microbiene formate pe plăcile de plastic au fost resuspendate în acid acetic 33%, iar intensitatea suspensiei colorate a fost citită spectrophotometric la 492 nm.

### 6.3 Rezultate și discuții

*Evaluarea calitativă a activității antimicrobiene* este o metodă care evidențiază rezistența fenotipică a tulpinilor testate. Substanțele antimicrobiene difuzează în agar și inhibă germinarea și dezvoltarea microorganismelor testate, formându-se zone de inhibiție.

Evaluarea calitativă a efectului inhibitor al extractelor de nuc, salvie și echinacea a evidențiat diferențe între valorile zonelor de inhibiție obținute pentru control și extractele tratate cu fascicul laser cu o putere la ieșirea prin vârful fibrei tip E4 de 3 W și respectiv 5 W.

Se observă că iradierea extractelor cu fasciculul cu puterea de 3 W a determinat obținerea unor diametre ale zonelor de inhibiție mai mari comparativ cu cele ale extractelor netratate și cu cele iradiate la puterea de 5 W. Extractele hidroalcoolice din fructul de nuc, respectiv extractul în apă:metanol din peretele din interiorul cotiledonului (N20) și extractul în apă:metanol din pericarp și mezocarp liofilizate (N19) și extractul hidro-alcoolic din salvie nu au prezentat activitate antimicrobiană .

*Determinarea cantitativă a efectului inhibitor al extractelor* analizate prin metoda microdiluțiilor a evidențiat faptul că tratarea cu fascicul laser a extractelor vegetale îmbunătățește efectul antibacterian. Extractele din tegument seminal (N11), din peretele din interiorul cotiledonului (N20), din pericarp și mezocarp (N5,N19) obținute din fructele de nuc, dar și extractele din salvie și echinacea, tratate cu fasciculul laser au exercitat efect inhibitor la concentrații mai mici comparativ cu extractul netratat.

Comparând expunerea la cele 2 puteri de ieșire de la vârful fibrei s-a observat că prin activarea soluțiilor cu fasciculul laser cu puterea de 5 W se mărește eficiența tuturor extractelor testate.

Cel mai eficient dintre extractele testate a fost cel obținut în soluție metanolică din tegument seminal de fruct de nuc (N11) și diferența cea mai evidentă între extractele tratate și control s-a înregistrat pentru formulele N7 (extractul în etanol din endocarp de *J. regia*) și S (extractul de *S. officinalis*).

Așa cum am precizat, în cadrul studiului, s-a testat și efectul bactericid al extractelor iradiate. Cel mai eficient extract a fost cel din *tegument seminal de nuc*, urmat de cel de salvie.

Ca și în cazul celorlalte teste efectuate, s-a observat o potențare a efectului antimicrobian în urma activării soluțiilor de testat prin aplicarea unui fascicul laser cu puterea de 5W, cu excepția tincturii de echinacea.

Biofilmele formate de tulpina de *Enterococcus faecalis* sunt inhibitate de extractele netratate folosite în cadrul cercetării, cu cea mai bună evaluare pentru extractul în metanol din tegument seminal de *J. regia* (N11).

Se constată că prin tratarea și activarea în prealabil cu fascicul laser cu puterea la vârful fibrei de 5 W, concentrații sub 1% ale extractelor obținute din tegument seminal de fruct de nuc (N11) și din salvie (S), inhibă biofilmele formate de tulpina de *Enterococcus faecalis*.

În literatura de specialitate se regăsec studii ce au obținut rezultate similare privind efectul antibacterian al unora dintre extractele naturale folosite în această cercetare dar și pentru alte extracte de plante.

Astfel, Vieira și colab., (2020), au analizat efectul antimicrobian al unui extract hidroetanolic din coajă verde de nucă, pe o serie de bacterii, printre care și *E. faecalis* și a determinat valoarea CMIIa 20 mg/mL, în timp ce concentrația bactericidă a fost mai mare de 20 mg/mL, efect antibacterian confirmat și de rezultatele obținute prin cercetarea personală efectuată.

Deshpande și colab., (2011), au raportat că extractul de nuc s-a dovedit a fi cel mai eficient dintre extracte, ca antimicrobian împotriva microflorei orale, deosebindu-se de rezultatele cercetării mele prin folosirea extractului din coaja de nuc și eficiența acestuia asupra florei microbiene din salivă, nefiind menționat *E. faecalis*.

Într-un alt studiu, al lui Alkhawajah A M, (1997), a fost testat extractul de coajă de nuc care a dovedit o activitate antimicrobiană cu spectru larg într-o manieră dependentă de doză; a fost raportat că acesta inhibă creșterea mai multor microorganisme patogene, cum ar fi bacteriile Gram pozitive (*Staphylococcus aureus* și *Streptococcus mutans*), bacteriile Gram negative (*Escherichia coli* și *Pseudomonas aeruginosa*) și *Candida albicans* însă acest extract nu a fost testat asupra *E. faecalis* (Noumi E și colab., 2010, 2011).

Evaluarea activității antimicrobiene a extractelor etanolice și apoase din scoarță de nuc împotriva a patru specii de bacterii orale din saliva pacienților cu carii dentare (Zakavi și colab., 2013) a evidențiat că acestea inhibă semnificativ creșterea bacteriilor orale, iar tincura (extractul etanolic) a avut o eficacitate mai mare decât extractul apos ca antimicrobian împotriva microflorei orale patogene, studiu ce este asemănător cu rezultatele obținute în cercetarea personală în ceea ce privește eficacitatea crescută a extractelor alcoolice.

Extractul de *S. officinalis* cu o concentrație de 50mg/mL a fost eficient împotriva unui număr de 50 tulpini izolate din cavitatea orală și de referință (De Oliveira și colab., 2019).

Rezultatele cercetărilor mele sunt asemănătoare în sensul posibilității folosirii extractului de salvie pentru lavaj endodontic, cu rezultatele obținute de Mehraban A și colab., (2016), care a evaluat efectul antimicrobian al extractelor apos, etanolic și hidroalcoolic din rădăcina de salvia chorassanica, o specie indigenă iraniană, împotriva *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella typhimurium* și *Escherichia coli*, rezultate ce sugerează că extractele de salvia chorassanica au o capacitate antimicrobiană considerabilă împotriva tulpinilor studiate „in vitro” și pot fi folosite ca o alternativă la antibiotice.

Într-un studiu de evaluare a eficacității antimicrobiene a *S. officinalis* împotriva infecției cu *E. faecalis* în canalele radiculare a fost evaluată activitatea antimicrobiană a extractului metanolic de *S.officinalis*, ca soluție de irigare împotriva *E. faecalis* în comparație cu soluțiile convenționale de iriganți (NaOCl și CHX) utilizați în prezent în canalul radicular , studiu ce a prezentat că extractul de *S. officinalis* are o eficacitate antimicrobiană mult mai mică în comparație cu NaOCl și CHX (Guneser MB și colab., 2016).

În cercetarea asupra activității antimicrobiene a extractelor testate în cazul tincturii de echinacea am observat un răspuns moderat, chiar redus al acesteia, fără îmbunătățire, mai ales după activarea sa cu un fascicul laser. Sunt studii care susțin că prin constituenții din compoziția echinaceei, *alchilamide* și *poliacetilene*, derivați ai acidului cafeic și *polizaharide*, aceasta contribuie la creșterea producției și activității celulelor albe din sânge (limfocite și macrofage) fiind eficientă în gingivită și boala parodontală în combinație cu salvia, menta și mușetelul (Modarai și colab., 2009).

Analiza rezultatelor obținute evidențiază faptul că laserul diodă poate fi folosit în potențarea activității antimicrobiene a unor extracte vegetale. Studiile noastre confirmă rezultatele obținute de alți cercetători în sensul că încărcătura microbiană poate fi scăzută utilizând terapia fotodinamică (Garcez și colab., 2008; Garcez și colab., 2010; Siddiqui și colab., 2013; Tennert și colab., 2014; Arneiro și colab., 2014; Abdelkarim-Elafifi și colab., 2021).

Laserul diodă, alături de numeroasele beneficii, poate avea și unele efecte mai puțin pozitive încă incomplet determinate, de aceea este necesară determinarea parametrilor *in vitro* înainte de folosirea în practica clinică.

În literatura de specialitate au fost prezentate studii privind activitatea antibacteriană împotriva *E. faecalis* a unor extracte de plante cum ar fi extractul de smirnă , extractul de lemn dulce, extractul de Miswak, *Moringa triphala*, sucul *Citrifolia* și polifenolii de ceai verde pentru a fi utilizate ca iriganți în terapia endodontică (Salman BN și colab., 2017; Tyagi SP și colab., 2013).

Pentru a descoperi noi compuși au fost testate peste 2.000 de extracte de plante împotriva mai multor microorganisme, printre care *Enterococcus faecalis* (Suffredini IB și colab., 2006), iar Castilho AL și colab., (2013), în studiul realizat și-au propus să determine activitatea antibacteriană a 25 de extracte de plante și reziduurile acestora împotriva *E. faecalis* și să determine profilul chimic al extractelor active și al reziduurilor, prin cromatografie în strat subțire. Ca rezultat, extractele obținute din șapte plante, specii originare din pădurea tropicală amazoniană, au prezentat o activitate semnificativă in vitro împotriva *E. faecalis* și șase din cele șapte extracte s-au dovedit a fi eficiente în prevenirea formării biofilmului.

#### **6.4 Concluzii**

Extractele vegetale testate în studiul efectuat au cu certitudine proprietăți antibacteriene.

Prin iradiere cu fascicule laser ale laserului diodă cu lungimea de undă 940 nm, cu cele două variante de putere (3 W și 5 W), se constată acțiunea de potențare a efectului antimicrobian al soluțiilor, extractelor de plante, ce pot fi folosite pentru reducerea bacteriilor consecutiv irigării canalelor radiculare.

Efectul antimicrobian al soluțiilor iradiate cu fascicul laser cu puterea de 5 W a fost superior celui obținut în cazul soluțiilor iradiate cu fascicul laser cu puterea de 3 W.

Cel mai eficient extract a fost cel din tegument seminal de nuc, urmat de cel de salvie, iar biofilmele formate de tulpina de *Enterococcus faecalis* au fost inhibitate de concentrații sub 1% ale extractelor obținute din tegument seminal de fruct de nuc și din salvie, tratate în prealabil cu fascicul laser cu puterea la vârful fibrei de 5 W.

## **CAPITOLUL 7. EVALUAREA BIOCOMPATIBILITĂȚII PRODUSELOR NATURALE, FOLOSITE CA ADJUVANTE ÎN IRIGAREA ȘI IGIENIZAREA CANALELOR RADICULARE, IRADIATE CU UN FASCICUL AL LASERULUI DIODĂ 940 NM**

### **7.1 Introducere**

Terapia endodontică se bazează pe curățarea, modelarea și etanșarea sistemului endodontic reprezentat de canalul radicular pentru a obține dizolvarea completă a țesutului pulpar rezidual, eliminarea bacteriilor din spațiul canalului radicular și prevenirea recontaminării după tratament.

Odată ce canalul radicular este infectat coronar, infecția progresează apical, iar microorganismele și produsele lor (endotoxinele) produc leziuni pulpare și periapicale.

Canalele radiculare cu infecții primare conțin o încărcătură bacteriană mare, polimicrobiană cu dominarea bacteriilor anaerobe, iar *Enterococcus faecalis* este predominant în infecțiile persistente după tratamentul canalului radicular și unul dintre cele mai comune organisme care pot fi cultivate din canalele radiculare care sunt supuse retratării.

Soluțiile de irigare sunt considerate a fi esențiale iar obiectivele irigării sunt atât mecanice, cât și biologice. Prin urmare, soluțiile ideale pentru lavaj endodontic sunt cele care posedă proprietăți antimicrobiene bune împotriva unui spectru larg de microorganisme și care vor spori rezultatul procedurilor de instrumentare, inactivează factorii de virulență bacterieni, cum ar fi endotoxinele și acizii lipoteicoici, perturbă formarea și favorizează îndepărtarea biofilmului, ajută la dizolvarea resturilor de țesut pulpar și la îndepărtarea țesutului dur acumulat și a stratului de frotiu sau previne formarea lor, nu prezintă efecte adverse, atât locale (asupra dentinei și țesuturilor periapicale) cât și sistemice (toxicitate, reacții alergice) și prezintă disponibilitate mare la costuri reduse.

În prezent, nu există un singur irigant care să îndeplinească toate cerințele menționate anterior, astfel încât în practică apare necesitatea combinării iriganților, dar și găsirea unor soluții alternative.

Așa cum am experimentat în cel de al doilea studiu realizat în cadrul cercetării doctorale, extractele vegetale din nuc, salvie și echinacea au dovedit proprietăți antibacteriene favorabile consecutiv testelor efectuate asupra *E.faecalis* cu creșterea activității microbicide asupra biofilmului format de *E.faecalis*, ca urmare a activării acestora prin iradiere cu un fascicul laser diodă cu lungimea de undă de 940 nm, cu puterea de ieșire la vârful fibrei de 3W și 5W, dovedind astfel potențial în vederea folosirii pentru lavaj împreună cu tratamentul mecanic al canalelor radiculare. Studii recente indică faptul că, pe lângă efectul bactericid, laserul cu diodă are un efect biostimulator care este de mare importanță în ceea ce privește vindecarea țesuturilor periapicale. Stimulează proliferarea celulară și prezintă un efect inhibitor asupra enzimelor de propagare a inflamației (Siqueira JF și colab., 2000).

**Scopul** acestui studiu in vitro a fost de a examina implicațiile toxicologice potențiale ale extractelor de plante de: nuc (*Juglans regia*), salvie (*Salvia officinalis*) și tinctura de echinacea (*Echinacea purpurea*) și evidențierea biocompatibilității acestora.

## 7.2 Material și metodă

În cadrul acestui studiu, s-au utilizat aceleași extracte vegetale, preparate din nuc (*Juglans regia*), din salvie (*Salvia officinalis*) și echinacea (*Echinacea purpurea*). S-au folosit fructele de nuc, frunzele de salvie și părțile supraterane de echinacea, iar modul de preparare și codificarea probelor sunt aceleași cu cele folosite și prezentate anterior, în studiul al doilea.

Biocompatibilitatea compușilor, reprezentați de extractele de plante preparate și de extractele de plante activate cu un fascicul laser emis de laserul diodă cu lungimea de undă 940 nm cu puterea la ieșire, la vârful fibrei, de 3W și 5W, timp de 30 de secunde, a fost evaluată pe fibroblaste ATCC L929, cultivate în mediu DMEM (Dulbecco s Modified Eagle Medium) suplimentat cu 10 % ser fetalbovin.

Celulele au fost însămânțate la o densitate de  $1,5 \times 10^4$  celule pe godeu în 200  $\mu$ l de mediu de cultură, peste care s-au pus extractele de testat (diluție 1:10) și s-au incubat la 37 °C (5% CO<sub>2</sub>) timp de 24 ore.

Evaluarea gradului de biocompatibilitate (citotoxicitatea materialelor) s-a realizat prin testul Mosmann Tetrazolium Toxicity (MTT).

Testul MTT este un test de viabilitate ce permite evaluarea cantitativă a celulelor vii din cultură. Compusul MTT [bromură de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliu] este permeabil pentru membranele celulelor vii.

După metabolizarea compusului MTT se formează cristale de formazan solubile în izopropanol, rezultă o soluție (culoare violet) cu densitatea optică ce poate fi citită spectrofotometric la 550 nm lungime de undă.

Pentru testul MTT în placa de testat cu celule L 929 cu 96 de godeuri s-a îndepărtat restul de mediu de cultură, s-a spălat suprafața cu soluție salină pentru a îndepărta orice urmă de ser fetal bovin, care inhibă compusul MTT, s-a preparat o soluție de MTT 1mg/ml și fiecare probă a fost incubată în prezența a 1 ml soluție MTT timp de 4 h la 37°C și 5%CO<sub>2</sub>. Pentru a se putea face citirea rezultatelor, cristalele de formazan formate au fost solubilizate cu izopropanol.

Soluția rezultată, de culoare violet, a fost citită la spectrofotometru la 550 nm. Intensitatea culorii este direct proporțională cu numărul de celule vii din probă.

Pentru cuantificarea enzimei citosolice lactat dehidrogenaza (LDH) care se eliberează în mediul extracelular în momentul în care celulele au integritatea afectată (membrana celulară este deteriorată), s-a folosit kit-ul Cytotoxicity Detection KitPLUS (LDH) producător Roche Applied Science.

S-au pregătit 100 $\mu$ l mix de reacție care a conținut în mod egal toate componentele mixului, iar din placa de testat s-au colectat 50 $\mu$ l de mediu în duplicat și s-au transferat într-o placă de 96 de godeuri. După ce s-au adăugat 100  $\mu$ l peste fiecare probă placa a fost pusă la incubat timp de 15-20 de minute la întuneric. Pe baza nivelului de LDH din mediul de cultură, intensitatea culorii soluției de culoare roz a variat direct proporțional cu numărul de celule moarte din probă. S-a citit spectrofotometric (Flex Station 3) la o lungime de undă de 490 nm.

Pentru a considera o anumită probă biocompatibilă, valorile densităților optice pentru testele MTT trebuie să fie mai mari decât cele ale testului de cuantificare LDH (mai exact, spunem că o proba este biocompatibilă dacă, cantitatea celulelor viabile, metabolic active este mai mare decât cea a celulelor moarte).



### 7.3 Rezultate și discuții

Analiza extractelor incluse în studiu, din punct de vedere al biocompatibilității a evidențiat faptul că iradierea influențează caracteristicile extractelor și capacitatea lor de a reacționa cu indicatorii metabolici utilizați în testare. Pentru extractul în etanol din endocarp (N7) s-a observat că după iradierea cu un fascicul laser de 5 W se mărește considerabil numărul celulelor viabile, valoarea MTT fiind mult superioară celui LDH.

Extractul în metanol din tegument seminal de *Juglans regia* (N11) în urma iradierii își pierde din biocompatibilitate corespunzător cu intensitatea aplicată, însă nu devine citotoxic.

Extractul hidroalcoolic, apă-metanol, din peretele din interiorul cotiledonului de *J. regia* în urma tratamentului cu fascicule de laser cu puterea de 3 W și respectiv 5 W, prezintă valori ale densităților optice pentru testele MTT mai mari decât cele ale testului de cuantificare LDH proporțional cu intensitatea fasciculului utilizat (Vasilache A și colab., 2021)

Deși inițial extractul în apă-metanol din pericarp și mezocarp liofilizate de *J. regia*, era biocompatibil, tratamentul cu un fascicul laser de 5 W, timp de 30s, a determinat înregistrarea unei valori ridicate a absorbanței LDH comparativ cu MTT, valoare care evidențiază prezența în număr mare a celulelor moarte și respectiv citotoxicitatea extractului.

Pentru extractul alcoolic, în metanol din pericarp și mezocarp liofilizate de *J. regia* s-a observat îmbunătățirea caracteristicilor, astfel că deși inițial extractul a fost citotoxic, în urma iradierii, prin aplicarea fasciculului laser cu intensitate de 5 W, valorile înregistrate pentru MTT au depășit valorile pentru LDH, extractul fiind compatibil.

Analiza rezultatelor obținute evidențiază faptul că laserul diodă cu lungimea de undă 940 nm, cu puterea la ieșire a fasciculului de 3 W dar mai ales de 5 W, timp de 30 secunde, a potențat biocompatibilitatea extractelor vegetale folosite în studiu. Acest rezultat ne permite să apreciem că laserul diodă 940 nm poate fi folosit și pentru potențarea biocompatibilității altor extracte vegetale.

Rezultatele acestui studiu, prin asigurarea unui grad crescut de biocompatibilitate soluțiilor testate, consecutiv iradierii cu fasciculul laser al laserului diodă cu lungimea de undă de 940 nm, confirmă rezultatele prezentate de alți cercetători în sensul efectelor pozitive obținute utilizând terapia fotodinamică (Garcez și colab., 2008; Garcez și colab., 2010; Siddiqui și colab., 2013; Tennert și colab., 2014; Arneiro și colab., 2014; Abdelkarim-Elafifi și colab., 2021).

De asemenea, Spangberg L. și colab., (1973) și Türkün M. și colab., (1998) au comparat în studiile lor efectul antimicrobian, proprietățile chimice și biocompatibilitatea iriganților folosiți în endodonție pentru a stabili o soluție ideală de utilizat ca adjuvant al tratamentului de canal. Studiul efectuat de Gomes-Filho și colab., (2008), pentru a compara reacția țesutului conjunctivsubcutanat la

șobolan injectat cu soluția sau gelul de gluconat de clorhexidină 0,9%, hipoclorit de sodiu 2,5% , 5,25% și 2%, a evidențiat că soluția salină 0,9%, soluția de clorhexidină 2,0% și NaOCl 2,5% au prezentat o biocompatibilitate bună. Rezultatele studiului indică faptul că NaOCl 5,25% a fost cel mai toxic irigant endodontic pentru țesutul conjunctiv subcutanat la sfârșitul perioadei de evaluare.

Așadar datorită proprietăților antimicrobiene bune și citotoxicității reduse unele din produsele naturale reprezentate de extractele de plante testate, tratate cu fascicul laser cu intensitate de 5 W pot fi utilizate în tratarea infecțiilor de la nivelul canalului radicular.

#### 7.4 Concluzii

Analiza extractelor preparate din nuc (*Juglans regia*), din salvie (*Salvia officinalis*) și echinacea (*Echinacea purpurea*), din punct de vedere al biocompatibilității, a evidențiat faptul că iradierea influențează caracteristicile acestora și capacitatea lor de a reacționa cu indicatorii metabolici utilizați în testare.

Pentru extractul etanolic din endocarp de *J. regia* s-a observat că după iradierea cu un fascicul al laserului diodă cu lungimea de undă 940 nm cu puterea la ieșire de 5 W, timp de 30 secunde, se mărește considerabil numărul celulelor viabile, deci biocompatibilitatea produsului crește.

Pentru extractul în metanol din pericarp și mezocarp liofilizate de *J. regia* s-a observat îmbunătățirea caracteristicilor, astfel că deși inițial extractul a fost citotoxic, în urma iradierii cu un fascicul al laserului diodă cu lungimea de undă 940 nm, cu intensitate de 5 W, extractul devine compatibil. Absența citotoxicității și compatibilitatea extractelor vegetale testate oferă posibilitatea folosirii acestora în terapia endodontică, ca o posibilă alternativă la soluțiile de lavaj clasice.

În ciuda așteptărilor mari pentru implementarea lor în toate domeniile stomatologiei, efectele laserilor sunt încă cercetate. În viitorul apropiat laserii au potențialul de a se afirma ca o alternativă, o completare la terapiile convenționale.

Sunt recomandate studii suplimentare *in vitro* și mai ales *in vivo*, atât pentru laseri cât și pentru extractele de plante simple și/sau activate cu lumina laser, înainte de utilizare, cu privire la eficacitatea acestora în canalele radiculare împotriva biofilmelor, biocompatibilitatea și capacitatea lor de a eradica stratul de frotiu dentinar.

## CONCLUZII GENERALE ȘI CONTRIBUȚII PERSONALE

Concluziile generale sintetice se rezumă la câteva aspecte esențiale în legătură cu aplicabilitatea laserilor, astfel:

Terapia laser este tot mai frecvent utilizată și din ce în ce mai populară în domeniul stomatologiei datorită avantajelor pe care le oferă, iar gama de proceduri efectuate cu succes cu laseri pe țesuturile dentare se extinde continuu. Laserii utilizați frecvent în prezent în stomatologie sunt de dimensiuni mici, extrem de ușori, portabili și cu un preț rezonabil.

Aplicațiile laserului au îmbunătățit prognosticul și rezultatul tratamentelor stomatologice astfel că în viitorul apropiat laserii au potențialul de a se afirma ca o alternativă , o completare la terapiile convenționale.

Deoarece printre avantajele folosirii terapiei cu laser se remarcă acțiunea antimicrobiană, antiinflamatoare și cu efect stimulatив pentru vindecare mi-am propus să evaluez utilizarea ei ca adjuvant pentru decontaminare în terapia endodontică clasică.

Numeroase studii asupra diferitelor tipuri de laseri care sunt utilizați în endodonție demonstrează beneficiile pe care le oferă fiecare atunci când este aplicat corect, ținând cont de lungimea de undă și caracteristicile optice ale țesutului iradiat, pentru a îmbunătăți rezultatele obținute în urma procedurilor tradiționale cu un impact revoluționar pentru dezinfectarea canalului radicular.

Utilizarea laserului diodă în tratamentul endodontic a devenit din ce în ce mai frecventă în ultimii ani și s-a evaluat eficiența antibacteriană a laserului diodă 940 nm la diferite puteri de ieșire. Studiile efectuate în cadrul tezei susțin faptul că folosirea terapiei laser și a terapiei fotodinamice, adjuvant în procedurile endodontice de decontaminare, cu laserul diodă cu lungimea de undă de 940 nm prezintă activitate antimicrobiană in vitro împotriva *C. albicans* și *E. faecalis*.

Iradieră suspensiei microbiene cu laserul diodă a evidențiat faptul că timpul de contact prin numărul de iradiere influențează în mică măsură viabilitatea microbiană în timp ce în aceleași condiții de iradiere vârful de aplicare folosit , evidențiază diferențe semnificative statistic în reducerea numărului de bacterii viabile la un timp de iradiere crescut la 15 secunde, cu o intensitate a puterii de 3 W și mod de aplicare pulsant (CP2).

Deși laserul cu diodă a arătat o reducere semnificativă în numărul de colonii de bacterii după aplicare, chiar după mărirea timpului și puterii aplicate, acesta singur nu a fost suficient de eficient pentru a elimina în totalitate tulpinile bacteriene folosite în studiile efectuate respectiv *E. faecalis* și *C. albicans*.

Așa cum am mai precizat eficacitatea terapiei fotodinamice depinde de microorganism, de fotosensibilizant și de caracteristicile și parametrii laserului utilizat. Conform rezultatelor noastre, albastrul de toluidină a arătat un efect fotodinamic antimicrobian mai mare pentru *E.faecalis* decât albastrul de metilen și un efect mai mare la un volum crescut, respectiv atunci când am folosit o proporție mai mare, de 1/10 de albastru de toluidină.

În prezența albastrului de toluidină, folosirea laserului la puteri de 3 și 4 W au dus la scăderea numărului de unități formatoare de colonii. Cea mai eficientă condiție de iradiere pentru scăderea numărului de bacterii viabile a fost cea cu următorii parametri: timp 30 secunde, la o putere de 5 W în modul pulsat CP2, cu vârful E3.

Folosirea unui timp mai îndelungat de aplicare crește eficiența, iar la același timp de iradiere, numărul iradierilor influențează pozitiv scăderea viabilității microbiene.

În ceea ce privește viabilitatea *C.albicans*, la aceleași condiții de timp de aplicare a fasciculului laser, număr de iradieri, folosind același vârf, numai modificarea puterii (4,5 W) a determinat o reducere a viabilității microbiene, reducere care a devenit semnificativă cu creșterea puterii la 5,5 W cu vârful E3 și la puterea de 6,5 W cu vârful neinițiat. Testarea unor volume diferite cu aceiași parametri ai laserului nu a evidențiat diferențe semnificative statistic în ceea ce privește reducerea încărcăturii microbiene.

Astfel laserul cu diodă poate fi considerat o alternativă în tratamentul endodontic pentru dezinfecția canalului radicular fie singular, fie în cadrul terapiei fotodinamice antimicrobiene.

Terapia combinată constând în irigare cu soluții și iradiere cu laserul diodă 940 nm, precum și activarea soluțiilor cu laser, reprezintă o opțiune de tratament eficientă pentru reducerea *E. faecalis* precum și a altor microorganisme patogene prezente în flora bacteriană din sistemul de canal radicular.

Extractele vegetale testate în studiile efectuate au cu certitudine proprietăți antibacteriene. Prin iradiere cu fascicule laser ale laserului dioda cu lungimea de undă 940 nm, cu cele două variante de putere la ieșire la vârful fibrei, de 3 W și 5 W, timp de 30 secunde, se constată acțiunea de potențare a efectului antimicrobian al soluțiilor folosite.

Efectul antimicrobian al soluțiilor iradiate cu fasciculul laser cu puterea de 5 W a fost superior celui obținut în cazul soluțiilor iradiate cu fascicul laser cu puterea de 3 W.

Cel mai eficient extract a fost cel din tegument seminal de nuc, urmat de cel de salvie, iar biofilmele formate de tulpina de *Enterococcus faecalis* au fost inhibitate prin aplicarea extractelor obținute din tegument seminal de nuc și din salvie, tratate în prealabil cu fascicul laser de 5 W timp de 30 secunde.

Analiza extractelor preparate din nuc (*Juglans regia*), din salvie (*Salvia officinalis*) și echinacea (*Echinacea purpurea*), din punct de vedere al biocompatibilității, a evidențiat faptul că iradierea influențează caracteristicile acestora și capacitatea lor de a reacționa cu indicatorii metabolici utilizați în testare.

Pentru extractul etanolic din endocarp din *J. regia* s-a observat că după iradierea cu un fascicul cu intensitatea de 5 W se mărește considerabil numărul celulelor viabile, extractul fiind biocompatibil.

Pentru extractul în metanol din pericarp și mezocarp liofilizate de *J. regia* s-a observat îmbunătățirea caracteristicilor, astfel că deși inițial extractul a fost citotoxic, în urma tratamentului și iradierii cu un fascicul laser cu intensitate de 5 W timp de 30 secunde, extractul devine compatibil.

Tehnologia laser, folosită împreună cu soluțiile de irigație clasice și cu cele pe bază de extracte naturale, îmbunătățește capacitatea de curățare, îndepărtarea resturilor și a stratului de frotiu din canalele radiculare, îmbunătățind astfel decontaminarea sistemului endodontic, efectul lor fiind direct legat de timpul și cantitatea de iradiere și de nivelul energiei emise.

Extractele din plante și cu specificitate extractele testate în cadrul tezei, folosite ca atare și ca extracte activate cu laser, nu au fost cercetate, astfel că ar putea fi începutul unei noi etape în această eră modernă a endodonției, și putem formula ipoteza că unele dintre aceste substanțe fitoterapeutice activate și folosite simultan cu laseri ar putea fi o alternativă potențială, la soluțiile de irigație de vârf din domeniu, pentru tratamentul biomecanic al spațiului endodontic.

Utilizarea laserului cu diode cu lungimea de undă de 940 nm este eficientă și în siguranță, ca adjuvant, ca o completare a tratamentului endodontic, folosit la momentul potrivit, cu setări prestabilite testate, sigure, în vederea îmbunătățirii rezultatelor acestuia.

## RECOMANDĂRI

Extractele vegetale tratate cu fascicul laser, testate în cadrul acestei teze, pot constitui o alternativă la soluțiile de irigație clasice în tratamentul endodontic.

Aceste extracte vegetale pot fi o variantă de tratament în cazul dinților deciduali sau a dinților permanenți tineri, unde hipocloritul de sodiu este contraindicat.

Sunt recomandate studii suplimentare, atât pentru laseri cât și pentru extractele de plante simple și/sau activate cu lumina laser, înainte de utilizare, cu privire la eficacitatea acestora în canalele radiculare. Dezvoltarea de soluții alternative pentru irigația canalelor radiculare, biocompatibile, cu funcționalitate ridicată și efecte secundare reduse este un obiectiv important pentru efectuarea unor terapii performante și tratamente de succes.

Studiile viitoare vor avea în vedere determinarea efectelor *in vitro* și *in vivo* și a altor protocoale de folosire a laserului diodă 940 nm, dar și a altor extracte vegetale singure sau încorporate în diferite formulări farmaceutice pentru determinarea unui potențial efect sinergic. Astfel, extinderea ariei de cercetare aferentă domeniului abordat în cadrul prezentei teze de doctorat ar putea avea în vedere următoarele aspecte :

Sursa, tipul și concentrația extractelor de plante precum și corelarea compoziției chimice și a parametrilor soluțiilor folosite cu caracteristicile programelor presetate ale laserului.

Sinteza și alegerea și altor materiale ce includ extracte naturale cu rol terapeutic și cu acțiune sinergică bine determinată cu a laserului diodă folosit.

Realizarea de teste de citotoxicitate și extinderea studiilor microbiologice și la alte tulpini bacteriene cu incidență nosocomială crescută.

De asemenea, avem în vedere evaluarea selectivității atât a programelor laser folosite cât și a extractelor din plante esențiale în ceea ce privește proprietățile anti-microbiene.

Rezultatele cercetării trebuie privite și prin perspectiva limitărilor asociate studiilor *in vitro*. Ar fi recomandată continuarea studiilor atât în ceea ce privește utilitatea laserului diodă cât și eficiența și biocompatibilitatea extractelor vegetale testate, singular sau activate cu laserul, în afecțiunile canalului radicular prin efectuarea de teste *in vivo*.

## CONTRIBUȚII PROPRII

Cercetarea mea a contribuit la o abordare pluri și interdisciplinară a tematicii studiate, colaborarea interdisciplinară fiind esențială, deoarece tratarea acestui subiect implică coroborarea unor noțiuni de terapie endodontică cu tehnică farmacologică, tehnologia materialelor dentare și tehnici de laborator de microbiologie generală.

Cercetările efectuate au implicat un studiu amănunțit al literaturii în vederea stabilirii modalităților de folosire, din punctul de vedere al programelor presetate, a laserului diodă cu lungimea de undă 940 nm, precum și în direcția alegerii anumitor extracte vegetale medicinale de interes .

Cercetările efectuate în cadrul acestei teze reprezintă, astfel, studii interdisciplinare de originalitate datorită mai multor aspecte:

- Studiarea unor extracte naturale medicinale, cunoscute pentru acțiunea antimicrobiană, acestea nefiind studiate sau testate până în prezent asupra florei microbiene din canalele radiculare infectate.
- Obținerea unor rezultate îmbunătățite prin folosirea soluțiilor activate cu fascicul laser, comparativ cu date din literatura de specialitate.
- Realizarea unor analize *in vitro* amănunțite și complexe pe probele tratate numai cu laser, pe probele cu extractele vegetale alese, singure sau activate cu laser, pentru determinarea multiplelor efecte benefice cu potential terapeutic.
- Determinarea *in vitro* a toxicității extractelor folosite în studiu singure sau activate cu laserul diodă cu lungimea de undă 940 nm.

## BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

Abdo S, Alkaisi A, Saleem M, Zetouni J. *Clinical Applications of Lasers in Endodontics*. J Dent Res. 2018; 1(1): 1003.

Abdelkarim-Elafifi H, Parada-Avenidaño I, Arnabat-Dominguez J. *Photodynamic Therapy in Endodontics: A Helpful Tool to Combat Antibiotic Resistance? A Literature Review*. Antibiotics (Basel), 2021, Sep 13;10(9):1106.

Aldelaimi AAK, Aldelaimi TN, Al-Gburi SM. *Using of Diode Laser (940 nm) in Orofacial Region*. J Res Med Dent Sci., 2017; 5(5): 34-39.

Arora S, Saquib SA, Algarni YA, Kader MA, Ahmad I, Alshahrani MY, Saluja P, Baba SM, Abdulla AM, Bavabeedu SS. *Synergistic Effect of Plant Extracts on Endodontic Pathogens Isolated from Teeth with Root Canal Treatment Failure: An In Vitro Study*. Antibiotics, 2021; 10(5):552:1-14.

Ashofteh K, Sohrabi K, Iranparvar K, Chiniforush N. *In vitro comparison of the antibacterial effect of three intracanal irrigants and diode laser on root canals infected with Enterococcus faecalis*. Iran J Microbiol. 2014;6(1):26–30.

Borzini L, Condò R, De Dominicis P, Casaglia A, Cerroni L. *Root Canal Irrigation: Chemical Agents and Plant Extracts Against Enterococcus faecalis*. The Open Dentistry Journal, 2016;10:692-703.

Castilho AL, Saraceni CHC, Collantes Díaz IE, Paciencia MLB, Suffredini IB. *New trends in dentistry: plant extracts against Enterococcus faecalis. The efficacy compared to chlorhexidin*. Braz Oral Res., (São Paulo), 2013, Mar-Apr;27(2):109-15.

Chifiriuc MC, Mihăescu G, Lazăr V. *Microbiologie și Virologie Medicală*, 2015, ed. 2, vol 1, Editura Universității din București, ISBN 978-606-16-0600-9.

Constanza M, Ibacache T, Arcos P, Sanchez S, Weinstein G. *Use of diode lasers in dentistry*, Clinical Dentistry Reviewed (2020) 4:6.

Deshpande R R, Kale A A, Ruikar A D et al. *Antimicrobial activity of different extracts of Juglans regia L. against oral Microflora*, 2011, International Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences, vol.3, no 2, p 200-201.

Eslami LM, Mehdi Vatanpour M, Aminzadeh N, Mehrvarzfar P, Taheri S. *The comparison of intracanal medicaments, diode laser and photodynamic therapy on removing the biofilm of Enterococcus faecalis and Candida albicans in the root canal system (ex-vivo study)*, Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, 26, 2019; 157-161, ISSN 1572-1000.

- De Freitas PM, Simões A. *Lasers in dentistry: guide for clinical practice*, 2015, 48:2173–2178.
- Garg N, Garg A. *Lasers in endodontics*, Textbook of Endodontics (Second ed.2010), Jaypee Brothers Medical Publishers: 503-511.
- Giroldo LM, Felipe MP, Oliveira MA, Munin E, Alves LP, Costa MS. *Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) with methylene blue increases membrane permeability in Candida albicans*. Lasers Med Sci, 2009, 24:109–112.
- Gomes-Filho JE, Aurélio KG, de Moraes Costa MMT, Bernabé PFE. *Comparison of the biocompatibility of different root canal irrigants*, J Appl Oral Sci. 2008;16(2):137-44.
- Hendi SS, Shiri M, Poormoradi B, Alikhani MY, Afshar S, Farmani A. *Antibacterial Effects of a 940 nm Diode Laser With/ Without Silver Nanoparticles Against Enterococcus faecalis*. J Lasers Med Sci. 2021, 24(12):73.
- Hmud, R., Kahler, W. A., George, R., and Walsh, L. J. (2010). *Cavitation effects in aqueous endodontic irrigants generated by near-infrared lasers*. Journal of Endodontics, 36(2): 275-278.
- Kang Y, Rabie AB, Wong R. *A Review of Laser Applications in Orthodontics*, IJO, 2014, 25(1):47-56.
- Kuzekanani M, Plotino G, Gutmann JL. *Current applications of lasers in endodontics*. Giornale Italiano di Endodonzia. 2019 Oct;33(2):13-23.
- Lagemann M, George R, Chai L, Walsh LJ. *Activation of ethylenediaminetetraacetic acid by a 940 nm diode laser for enhanced removal of smear layer*. Australian Endodontic Journal, 2014; 40(2):72-75.
- Lesniak G, Nowicka K, Pajaczkowska J, Matys M, Jacek & Szymonowicz, Kuroпка M, Rybak P, Dobrzyński Z, Dominiak M, (2019). *Effects of Nd:YAG laser irradiation on the growth of Candida albicans and Streptococcus mutans: in vitro study*. Lasers in Medical Science. 34. 10.1007/s10103-018-2622-6.
- Meire MA, De Prijck K, Coenye T, Nelis HJ, De Moor RJG. *Effectiveness of different laser systems to kill Enterococcus faecalis in aqueous suspension and in an infected tooth model*. Int Endod J. 2009;42:351–9.
- Mohammadi Z, Jafarzadeh H, Shalavi S, Palazzi F. *Recent Advances in Root Canal Disinfection: A Review*. Iran Endod J. 2017 Fall;12(4):402-406.
- De Moor RJG, Meire M. *High-Power Lasers in Endodontics - Fiber Placement for Laser-Enhanced Endodontics: in the Canal or at the Orifice? Journal of the Laser and Health Academy*, 2014; 1: 20-28.



Mustafa M Buraihi, Salah A Alkurtas. *The Photothermal Effect of 940nm Diode Laser on Enterococcus Faecalis Biofilm in Infected Root Canal*, J Res Med Sci, 2020,8 (7):480-486.

Noumi E, Snoussi M, N Trabelsi N et al. *Antibacterial, anticandidal and antioxidant activities of *Salvadora persica* and *Juglans regia* L. extracts*, Journal of Medicinal Plant Research, 2011, vol. 5, no. 17, pp. 4138–4146.

De Oliveira JR, Vilela PGDF, Almeida RBA, de Oliveira FE, Carvalho CAT, Camargo SEA, Jorge AOC, de Oliveira LD. *Antimicrobial activity of noncytotoxic concentrations of *Salvia officinalis* extract against bacterial and fungal species from the oral cavity*. Gen Dent. 2019 Jan- Feb;67(1):22-26. PMID: 30644826.

Olivi G. *Laser use in endodontics: Evolution from direct laser irradiation to laser-activated irrigation*. J Laser Dent., 2013;21:58-71.

Ordinola-Zapata R, Bramante CM, Aprecio RM, Handysides R, Jaramillo DE. *Biofilm removal by 6% sodium hypochlorite activated by different irrigation techniques*. Int Endod J. 2014;47(7):659-66.

Plotino G, Grande NM, Mercade M. *Photodynamic therapy in endodontics*. (2019) International Endodontic Journal, 52,760–774.

Ramu S, Arumugam K, Suresh M, Balasubramaniam A. *Applications of laser in the field of Endodontics: an update*, European Journal of Molecular & Clinical Medicine, 2020, ISSN 2515-8260, Volume 07, Issue 10, 646-650.

Seyedmousavi S, Hashemi SJ, Rezaie S, Fateh M, Djavid GE, Zibafar E et al., (2014) *Effects of low-level laser irradiation on the pathogenicity of *Candida albicans*: in vitro and in vivo study*. Photomed Laser Surg. 2014;32(6):322–329.

Shanthala BM, Wilson B, Joppan S and Srihari. *Current Uses of Diode Lasers in Dentistry, Otolaryngol (Sunnyvale)* 2017; Vol 7(2): 295.

Siddiqui SH, Awan KH, Javed F. *Bactericidal efficacy of photodynamic therapy against *Enterococcus faecalis* in infected root canals: a systematic literature review*. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2013 Dec;10(4):632-43.

Silva Garcez A, Núñez SC, Lage-Marques JL, Jorge AO, Ribeiro MS. *Efficiency of NaOCl and laser assisted photosensitization on the reduction of *Enterococcus faecalis* in vitro*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2006; 102:93–8.

Siqueira JF, Jr, Rôças IN, Favieri A, Lima KC. *Chemomechanical reduction of the bacterial population in the root canal after instrumentation and irrigation with 1%, 2.5%, and 5.25% sodium hypochlorite*. J Endod. 2000; 26:331–4.

Souza, R.C., Junqueira, J.C., Rossoni, R.D. et al. *Comparison of the photodynamic fungicidal efficacy of methylene blue, toluidine blue, malachite green and low-power laser irradiation alone against Candida albicans*. Lasers Med Sci **25**, 385–389 (2010).

Tennert C, Feldmann K, Haamann E, Al-Ahmad A, Follo M, Wrbas KT, Hellwig E, Altenburger MJ. *Effect of photodynamic therapy (PDT) on Enterococcus faecalis biofilm in experimental primary and secondary endodontic infections*. BMC Oral Health. 2014 Nov 4;14:132.

Tilakchand M, Singh NN, Yeli MM, Naik BD. *Evaluation of the antibacterial efficacy of EZLASE diode LASER on the infected root canal system: An in vivo study*. J Conserv Dent 2018;21:306-10.

Udart M, Stock K, Graser R, et al., *Inactivation of bacteria by high-power 940nm laser irradiation*. Med Laser App 2011; 26:166-171.

Vasilache A, Popa M, Albu CC, Dragomirescu AO, Vasilache A, Suciu I, Chirilă M, Ionescu E, *Evaluation of the antimicrobial effect of herbal extracts used as an adjuvant in the cleaning of root canals by laser beam irradiation*. Romanian Journal of Oral Rehabilitation, 2021; 13(2): 18-26.

Vasilache A, Popa M, Albu CC, Dragomirescu AO, Vasilache A, Bencze MA, Suciu I, Ionescu E, *Evaluation of the biocompatibility of laser irradiated plant extracts used as adjuvants in irrigation and sanitization of root canals*, Farmacia, 2021, Vol. 69 (5):934-940.

Vieira V, Pereira C, Abreu RMV, Calhelha RC, Alves MJ, Coutinho JAP, Ferreira O, Barros L, Ferreira ICFR. *Hydroethanolic extract of Juglans regia L. green husks: A source of bioactive phytochemicals*. Food Chem Toxicol. 2020; 137:111189.

Zezell DM, Ana PA, Pereira TM, et al. *Heat generation and transfer on biological tissues due to high-intensity laser irradiation*. Bernardes MAS (ed). Developments in Heat Transfer. Rijeka: In Tech, 2011: 227–246.

Wilson M, Mia N. *Sensitisation of Candida albicans to killing by low-power laser light* (1993), J Oral Pathol Med 22:354–357.