

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
„VICTOR BABEȘ” DIN TIMIȘOARA  
FACULTATEA DE MEDICINĂ  
DEPARTMENTUL I**

**RACEA ROBERT-COSMIN**



# **TEZĂ DE DOCTORAT**

**RECOVERY INTERVENTIONS AND TREATMENT IN ORAL  
PATHOLOGY**

Conducător de doctorat

**PROF. UNIV. DR. RUSU LAURA-CRISTINA**

**Timișoara  
2023**

# CUPRINS

LISTA ARTICOLELOR PUBLICATE .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
LISTA DE ABREVIERI .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
LISTA DE FIGURI .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
INTRODUCERE.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
PARTEA GENERALĂ .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
1. CANCERUL ORAL ȘI OROFARINGIAN-CARACTERIZARE GENERALĂ, CLASIFICARE, INDICENȚA GLOBALĂ.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
1.1. Cancerul orofaringian .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
1.2. Cancerul oral.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
1.3. Comportamentul materialelor dentare în cazul cancerelor bucale .....	9
1.4. Tratamentul stomatologic în cazul cancerelor bucale și orofaringiene .....	1 <b>Error! Bookmark not defined.</b>
1.4.1. Faza de pre-tratament.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b> 2
1.4.2. Faza de tratament .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
1.4.3. Terapia post-cancer .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
2. PRODUSELE NATURALE-NOI ALTERNATIVE SIGURE UTILIZATE ÎN STOMATOLOGIE.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
2.1. Produse naturale utile în cancerele bucale și orofaringiene.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b> 6
2.2. Eugenol-caracterizare generală, aplicabilitate în cancerele bucale și orofaringiene .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
PARTEA SPECIALĂ .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3. EUGENOL INDUCE APOPTOZA ÎN CELULELE DE CARCINOM SCUAMOS AL LIMBII PRIN MEDIEAREA EXPRESEI FAMILIEI BCL-2 .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b> 9
3.1. Introducere .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b> 9
3.2. Materiale și metode .....	30
3.2.1. Reagenși și culturi .....	31
3.2.2. Culturi celulare .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.2.3. Evaluarea viabilității celulare.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>

3.2.4.	Evaluarea morfologiei celulare, nucleare și citoscheletice .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.2.5.	Expresia genelor .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.2.6.	Analiza statistică .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.3.	Rezultate .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.3.1.	Evaluarea viabilității celulare.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.3.2.	Evaluarea morfologiei celulare, nucleare și citoscheletice .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.3.3.	Expresia genelor .....	39
3.4.	Discuții.....	40
3.5.	Concluzii.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>

#### 4. CARACTERIZAREA IN VITRO A PROFILULUI CITOTOXIC LUI EUGENOLULUI. APLICABILITATEA PROTOCOLOR IN VITRO ȘI IN OVO PENTRU A CONFIRMA RELEVANȚA ÎN DOMENIUL DENTAR.....**Error! Bookmark not defined.**

4.1. Eugenol: evaluare in vitro și in ovo pentru a explora efectele citotoxice asupra osteosarcomului și a celulelor canceroase orofaringiene.....	47
--	----

4.1.1. Introducere .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.1.2. Materiale și metode .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.1.2.1. Reagenți .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.1.2.2. Culturi celulare .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.1.2.3. Evaluarea viabilității celulare .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.1.2.4. evaluarea morfologiei nucleare .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.1.2.5. Raportul de expresie genetică .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.1.2.6. Activitatea Caspaselor-3/7, -8, și -9 .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.1.2.7. Testul RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis și Necrosis .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>

4.1.2.8. Testul Hen's Egg Test—Membrana Corioalantoică (HET-CAM)	.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.1.2.9. Analiza statistică	.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.1.3. Rezultate	.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.1.3.1. Evaluarea profilului citotoxic	.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.1.3.2. detectarea și cuantificarea modificărilor morfologice nucleare	.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.1.3.3. Studiul Real Time PCR și activitatea caspaselor	.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.1.3.4. Testul RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis și Necrosis	.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.1.3.5. Hen's Egg Test—Membrana Corioalantoică	.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.1.4. Discuții	.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.1.5. Concluzii	.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.2. Eugenolul: caracterizarea in vitro a profilului citotoxic la nivelul celulelor de carcinom colorectal	.....	<b>6Error! Bookmark not defined.</b>
4.2.1. Introducere	.....	64
4.2.2. Materiale și metode	.....	66
4.2.2.1. Reagenți și culturi	.....	66
4.2.2.2. Evaluarea viabilității celulare	.....	67
4.2.2.3. Morfologia celulară	.....	67
4.2.2.4. Colorarea prin imunofluorescență	.....	68
4.2.2.5. Analiza statistică	.....	68
4.2.3. Rezultate	.....	68
4.2.4. Discuții	.....	73
4.2.5. Concluzii	.....	75
4.3 Testarea profilului de siguranță al materialelor dentare pentru a confirma aplicabilitatea protocoalelor in vitro	.....	76

4.3.1. Introducere .....	76
4.3.2. Materiale și metode .....	78
4.3.2.1. Reagenți și culturi .....	78
4.3.2.2. Prepararea salivei artificiale.....	79
4.3.2.3. Perioada de păstrare a probelor în salivă artificială .....	79
4.3.2.4. Evaluarea viabilității celulare .....	80
4.3.2.5. Morfologie celulară.....	80
4.3.2.6. Testul de vindecare a rănilor .....	80
4.3.2.7. Imunocitochimia fluorescenței .....	81
4.3.2.8. Analiza statistică .....	81
4.3.3. Rezultate .....	82
4.3.3.1. Evaluarea viabilității celulare .....	82
4.3.3.2. Morfologie celulară.....	84
4.3.3.3. Testul de vindecare a rănilor .....	8Error! Bookmark not defined.
4.3.3.4. Imunocitochimia fluorescentă .....	88
4.3.4. Discuții .....	89
4.3.5. Concluzii.....	94
 5. CONȚINUT DE POLIFENOLI ȘI ACTIVITATE ANTITUMORĂ IN VITRO A EXTRACTULUI HIDROALCOOL DIN <i>ALBUM VISCUM</i> PE DOUĂ LINII CELULULE PIGMENTATE ȘI NEPIGMENTATE DE CANCER DE PIELE .....	
5.1. Introducere .....	95
5.2. Materiale și metode .....	96
5.2.1. Reagenți și culturi celulare .....	96
5.2.2. Prepararea extractului .....	97
5.2.3. Evaluarea viabilității celulare .....	98
5.2.4. Colorare nucleară .....	99
5.2.5. Analiza statistică.....	99
5.3. Rezultate .....	100
5.4. Discuții .....	104
5.5. Concluzii .....	107

6. EFECTELE BIOLOGICE ALE OZONULUI ASUPRA FIBROBLASTILOR GINGIVALE UMANE ȘI KERATINOCITELOR GINGIVALE .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
6.1. Introducere .....	108
6.2. Materiale și metode .....	110
6.2.1. Linii celulare .....	110
6.2.2. Culturi celulare .....	111
6.2.3. Design experimental .....	111
6.2.4. Impactul asupra morfologiei și confluenței celulare .....	112
6.3. Rezultate .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
6.3.1. Ozonul gazos afectează morfologia și confluența fibroblastelor gingivale primare.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
6.3.2. Efectul ozonului asupra morfologiei și confluenței keratinocitelor gingivale primare umane—PGK .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
6.4. Discuții.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
6.5. Concluzii.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
CONCLUZII .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
ARTICOLE PUBLIFICATE IN EXTENSO .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>

## Introducere

Cancerul este boala secolului XXI care afectează viețile a milioane de oameni, ducând adesea la evenimente fatale. Este o cauză principală de deces la nivel mondial, reprezentând aproximativ 9,9 milioane de decese în anul 2020. Cele mai frecvente tipuri de cancer la nivel mondial sunt cancerul pulmonar, de sân, colorectal, de prostată și de stomac. Cancerul bucal și orofaringian sunt tipurile de cancer care afectează gura și gâtul. Cancerul oral se referă la cancerul care afectează buzele, gingiile, limba și alte țesuturi din interiorul gurii, în timp ce cancerul orofaringian se referă la cancerul care afectează partea din spate a gâtului, inclusiv baza limbii și amigdalele. Cancerul oral și orofaringian sunt relativ mai puțin frecvente în comparație cu

alte tipuri de cancer, dar pot fi grave și pot pune viața în pericol dacă nu sunt detectate și tratate la timp.

Mai mulți factori de risc au fost asociați cu un risc crescut de a dezvolta cancer bucal și orofaringian, inclusiv: consumul de tutun, consumul de alcool (persoanele care fumează și beau alcool împreună au un risc și mai mare de a dezvolta aceste tipuri de cancer), Virusul papiloma uman (HPV) infecțiile (anumite tulpini de HPV au fost legate de un risc crescut de cancer orofaringian), vârsta (riscul de a dezvolta cancer bucal și orofaringian crește odată cu vârsta, majoritatea cazurilor aparând la persoanele cu vârsta peste 55 de ani), expunerea la soare (expunere prelungită la lumina soarelui poate crește riscul de cancer de buze), igiena orală slabă [1,2].

Tratamentul pentru cancerul bucal și orofaringian depinde de stadiul și localizarea cancerului, precum și de starea generală de sănătate a pacientului. Opțiunile de tratament pot include intervenții chirurgicale, chimioterapie, radioterapie și imunoterapie. Marele dezavantaj al tratamentelor actuale este lipsa selectivității, toxicitatea ridicată și adesea rezistența sau ineficiența. Datorită acestui fenomen, este imperativ necesar să se identifice alternative sigure, cu un grad ridicat de selectivitate în ceea ce privește tratamentul anticancer.

Eugenolul (Eug) (4-alil-2)-metoxifenolul este componenta principală a cuișoarelor (*Syzygium aromaticum* (L.) (Familia *Myrtaceae*), o plantă importantă în medicina tradițională [3]. O serie de proprietăți terapeutice sunt asociate cu Eug, inclusiv proprietăți antioxidante, antiinflamatorii, antimicrobiene, analgezice și antitumorale [4] În ceea ce privește proprietățile antitumorale ale eugenolului, s-a demonstrat că este benefic în mai multe tipuri de cancer, inclusiv cancerul oral, cancerul pulmonar, cancerul de piele, cancerul de sân, sau cancer colorectal. S-a demonstrat că Eug induce apoptoza celulară în celulele canceroase determinând o scădere a potențialului membranei mitocondriale și o creștere a producției de specii reactive de oxigen [5]. Până în prezent, însă, mecanismele biologice din spatele efectelor antitumorale ale Eug nu sunt pe deplin înțelese.

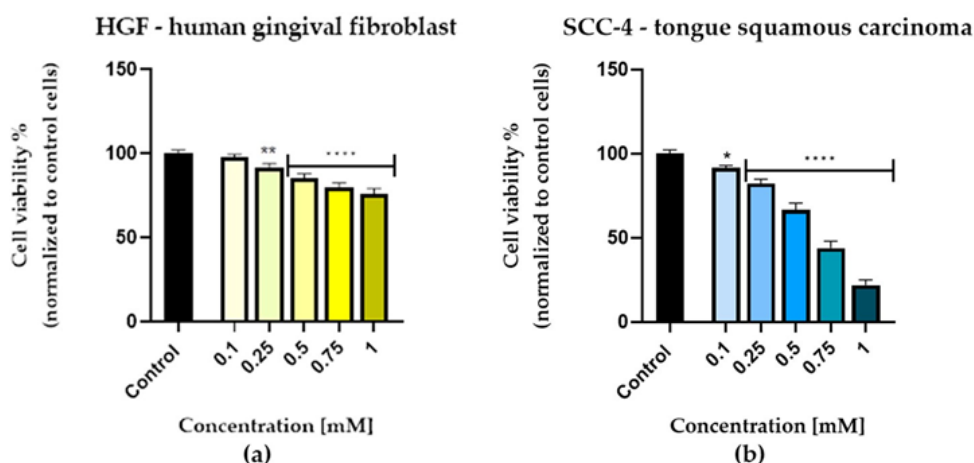
Astfel, scopul acestui studiu este de a face lumină asupra profilului de siguranță al materialelor și compușilor utilizați în procesul de prevenire și tratare a bolilor bucale.

Pentru atingerea scopului, s-au urmărit următoarele obiective: i) evaluarea citotoxicității in vitro a Eug pe carcinomul scuamos de limbă; ii) caracterizarea in vitro a profilului citotoxic la nivelul celulelor de osteosarcoma, carcinom faringian și colorectal; iii) evaluarea a două tipuri de ceramice la nivelul liniei celulare de cancer faringian Detroit 562 pentru a confirma aplicabilitatea metodelor in vitro în domeniul stomatologic; iv) analiza comparativă a altor compuși naturali în ceea ce privește activitatea antitumorală in vitro asupra carcinomului cu celule scuamoase; v) evaluarea efectelor biologice ale ozonușui utilizat în stomatologie, asupra procesului de

remineralizare a smalțului dentar și asupra morfologiei și confluenței celulelor gingivale primare umane: keratinocite și fibroblaste.

## Rezultate

Primul studiu a analizat citotoxicitatea Eug asupra fibroblastelor gingivale umane (HGF) și a celulelor de carcinom cu celule scuamoase (SCC-4). Astfel, după 72 de ore de stimulare cu 5 concentrații diferite de eugenol, 0,1 mM, 0,25 mM, 0,5 mM, 0,75 mM și 1 mM, testul MTT (3-(4,5 dimetiltiazol2-il)-2,5-difenilte- bromură de trazoliu) s-a efectuat. Figura 1 prezintă o scădere dependentă de concentrație a viabilității în ambele linii celulare.



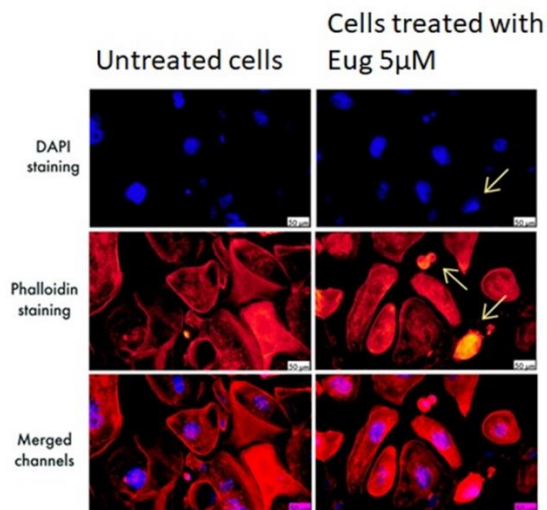
**Figura 1. Evaluarea in vitro a viabilității celulare a eugenolului (0,1 mM, 0,25 mM, 0,5 mM, 0,75 mM și 1 mM) pe HGF (fibroblaste gingivale umane) (a) și pe SCC-4 (carcinom cu celule scuamoase ale limbii) (b). Testul colorimetric MTT a fost efectuat după 72 de ore de tratament. Rezultatele sunt prezentate ca procente de viabilitate (%) normalizate la martor (celule tratate cu DMSO).**

Fibroblastele gingivale umane sănătoase nu au fost afectate semnificativ de concentrația de 0,1 mM, dar s-a observat o pierdere discretă a viabilității dependentă de doză la concentrații mai mari (0,5 mM, 0,75 mM și 1 mM). În linia celulară SCC-4, tratamentul de 72 de ore a produs o scădere a viabilității dependentă de concentrație în comparație cu celulele de control. În consecință, viabilitatea celulelor nu a scăzut semnificativ la cea mai mică concentrație testată (0,1 mM), viabilitatea fiind de aproximativ 91% în acest caz. În schimb, concentrațiile mai mari au dus la o reducere marcată a viabilității celulare, cel mai semnificativ efect observat la 1 mM, unde viabilitatea celulei a atins aproximativ 19% (Figura 1b).

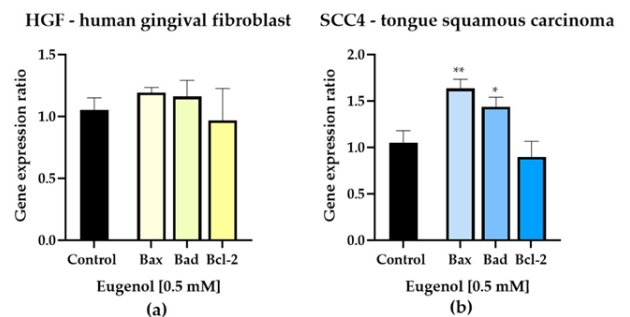
Folosind microscopia cu fluorescență, modificările nucleare și citoscheletice în fibroblastele gingivale umane și celulele de carcinom scuamos au fost analizate după tratamentul cu 0,5 mM Eug. Celulele HGF netratate nu au prezentat modificări nucleare sau citoscheletice la microscopie cu fluorescență, în timp ce în celulele tratate cu Eug, a fost observată o ușoară condensare nucleară. Celulele SCC-4 tratate cu Eug colorate cu DAPI au prezentat semne de condensare și fragmentare a cromatinei în interiorul nucleelor. Organizarea fibrelor de actină a



suferit modificări semnificative după tratamentul cu concentrația de 0,5 mM de Eug. În celulele colorate cu rodamină faloidină s-a observat condensarea fibrelor de actină, în special la periferie și rotunjire celulară. Evaluarea morfologică a fost efectuată în comparație cu celulele martor unde nu s-au observat modificări semnificative (Figura 2). În celulele de carcinom scuamos al limbii, doza subtoxică de Eug, 0,5 mM, a crescut semnificativ expresia ARNm pentru markerii proapoptotici - Bax și Bad, cea mai semnificativă creștere a fost înregistrată pentru expresia Bax. În plus, Eug nu a avut niciun efect semnificativ asupra expresiei Bcl-2, o genă anti-apoptotică (Figura 3).

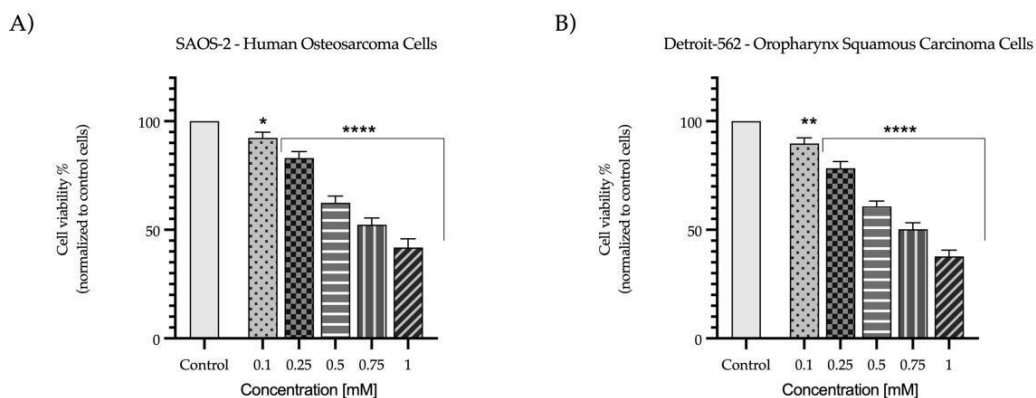


**Figura 2.** Celule SCC-4 vizualizate prin microscopie cu fluorescență, după tratament cu Eug 0,5 mM. Impactul Eug la nivelul: nucleelor—colorarea DAPI (albastru) și fibrelor F-actină—rodamină faloidină (roșu).



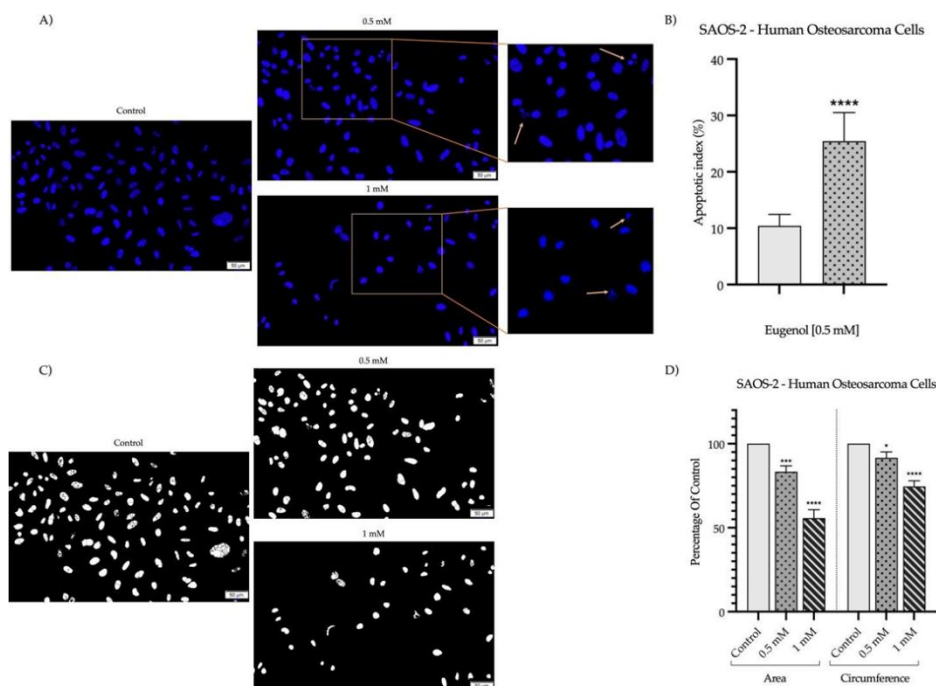
**Figura 3.** Expresia relativă a modificării pliului ARNm a markerilor proapoptotic (Bax și Bad) și anti-apoptotic (Bcl-2) în fibroblastul gingival uman (HGF) (a) și în celulele carcinomului scuamos al limbii (SCC-4) (b) 72 ore după expunerea la Eug 0,5 mM.

Următorul capitol sa axat pe evaluarea in vitro și in ovo a Eug pe osteosarcona, cancerul orofaringian și de colon, pentru a confirma aplicabilitatea testelor in vitro în domeniul stomatologic. Astfel, pentru a investiga potențialul activității antitumorale in vitro a Eug pe liniile celulare SAOS-2 și Detroit 562, a fost efectuat un test MTT la sfârșitul tratamentului de 72 de ore. Conform rezultatelor (Figura 4), Eug a exercitat o citotoxicitate dependentă de concentrație împotriva ambelor tipuri de celule canceroase.

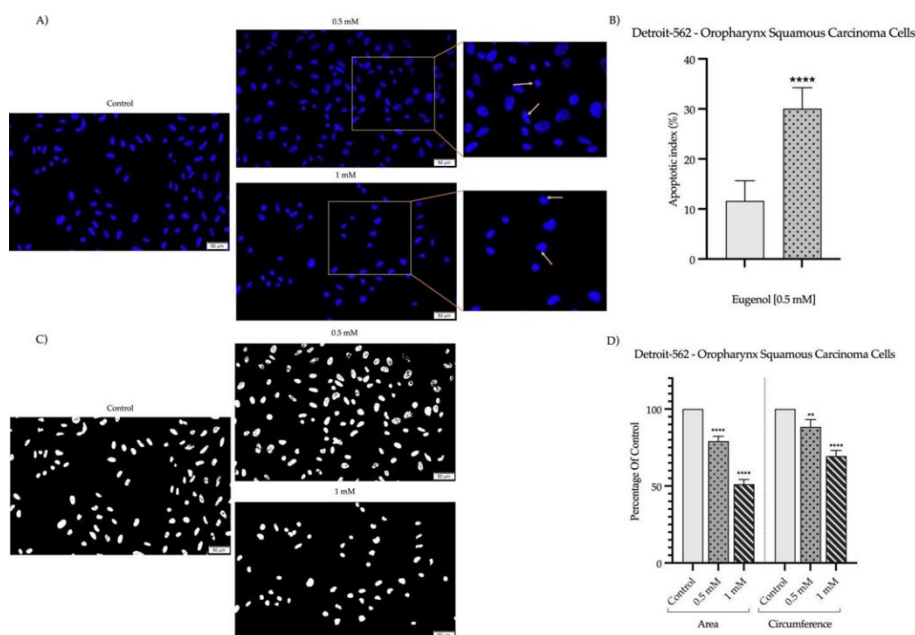


**Figura 4. Evaluarea in vitro a viabilității celulelor Eug (0,1, 0,25, 0,5, 0,75 și 1 mM) în: (A) SAOS-2 (celule de osteosarcom uman) și (B) Detroit-562 (celule de carcinom scuamos de orofaringe).**

Pentru a evalua mecanismul potențial de moarte celulară legat de citotoxicitatea Eug pe celulele canceroase SAOS-2 și Detroit-562, a fost efectuată colorarea DAPI pentru a evidenția modificările morfologice care apar la nivel nuclear la 72 de ore post-tratament. Comparativ, nucleeele celulelor SAOS-2 și Detroit-562 expuse la Eug (0,5 și 1 mM) au prezentat un aspect asemănător apoptotic, fiind fragmentate și condensate masiv. În consecință, a fost determinată o creștere semnificativă a indicelui apoptotic (la 25% pentru celulele SAOS-2 și 30% pentru celulele Detroit-562) în comparație cu controlul (Figura 5 și 6).

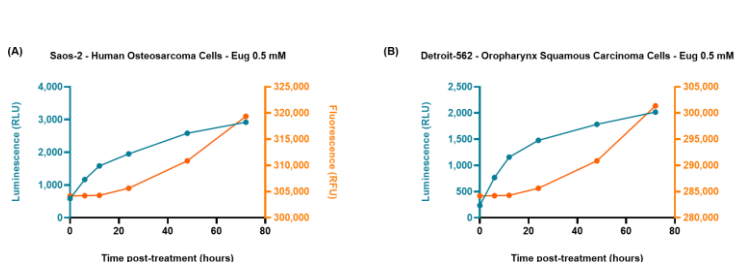


**Figura 5. (A) Nuclei SAOS-2 colorați cu DAPI după 72 de ore de tratament cu Eug (0,5 și 1 mM). Săgețile galbene indică semne de apoptoză. Barele de scară reprezintă 100 μm. (B) Determinarea indicelui apoptotic (AI) în celulele SAOS-2 colorate cu DAPI după un tratament de 72 de ore cu 0,5 mM Eug. (C) Analize ImageJ ale morfologiei nucleare. (D) În comparație cu celulele de control, stimularea Eug (0,5 și 1 mM) a condus la o scădere a ariei și circumferinței nucleelor**

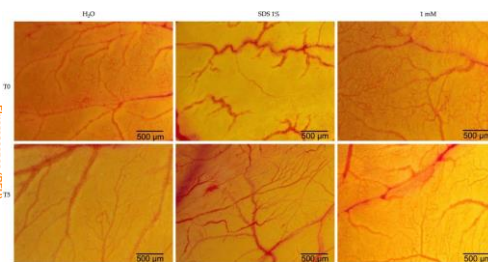


**Figura 6. (A)** Nuclei Detroit-562 colorați cu DAPI după 72 de ore de tratament cu Eug (0,5 și 1 mM). Săgețile galbene indică semne de apoptoză. Barele de scară reprezintă 100  $\mu$ m. **(B)** Determinarea indicelui apoptotic (AI) în celulele Detroit-562 colorate cu DAPI după un tratament de 72 de ore cu 0,5 mM Eug. **(C)** Analize ImageJ ale morfologiei nucleare. **(D)** În comparație cu celulele de control, stimularea Eug (0,5 și 1 mM) a condus la o scădere a ariei și circumferinței nucleelor

Capacitatea Eug 0,5 mM de a induce apoptoza în celulele canceroase SAOS-2 și Detroit-562 a fost de asemenea evaluată prin aplicarea unei metode cinetice pe bază de anexină. După cum este prezentat în Figura 7, tratamentul cu Eug 0,5 mM a indus o creștere dependentă de timp a semnalului de luminescență, care a precedat creșterea semnalului de fluorescență (indicând pierderea integrității membranei din cauza necrozei secundare), arătând astfel un răspuns apoptotic la ambii tratați. linii celulare după tratament. În plus, Eug a provocat liză vasculară și coagulare la nivel vascular, dar numai într-o măsură limitată (Figura 8).



**Figura 7. Celulele Saos-2 (A) și Detroit-562 (B) au fost tratate cu Eug 0,5 mM și reactivul RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis/Necrosis Assay.**

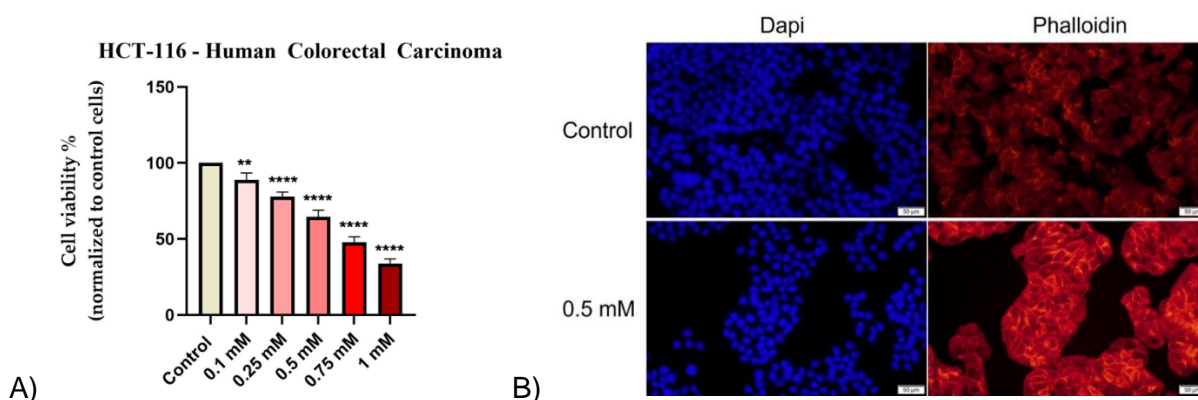


**Figura 8. Analiza potențialului iritant al eugenolului la o concentrație de 1 mM prin metoda HET-CAM.**

Un aspect important este faptul că produsele folosite în stomatologie, în cantități mai mici sau mai mari, pot ajunge în tractul gastro-intestinal, astfel în studiul următor, Eug a fost testat pe celulele canceroase colorectale HCT-116. Pe această linie celulară, Eug a scăzut procentul de celule viabile în funcție de concentrația testată. Prin urmare, la concentrația cea mai scăzută (0,1

mM), a fost observată o scădere semnificativă a viabilității celulare de aproximativ 88%. Cel mai semnificativ efect a fost observat la o concentrație de 1 mM, când procentul de celule viabile a scăzut la aproximativ 34% (Figura 9A).

Pe de altă parte, apoptoza celulară se caracterizează printr-o serie de modificări morfologice precum contracția celulară, apariția corpurilor apoptotice, rotunjirea celulelor. Toate aceste modificări au fost observate și în studiul de față, indicând faptul că Eug poate induce efect asemănător apoptotic. Efectul Eug 0,5 mM asupra structurii nucleelor și filamentelor de actină ale celulelor HCT-116 a fost examinat pentru a obține o înțelegere mai detaliată a țintelor potențiale și a mecanismelor biologice (Figura 9B).



**Figure 9. A) Evaluarea in vitro a efectelor citotoxice ale Eug (0,1, 0,25, 0,5, 0,75 și 1 mM) la nivelul carcinomului colorectal uman – HCT-116 după 72 de ore de tratament. B) Impactul Eug 0,5 mM în celulele HCT-116 asupra: colorarea nucleilor DAPI (albastru) și fibrelor F-actină-Phalloidin (roșu). Imaginile au fost realizate folosind obiectiv 20× la o bară de scară de 50 μm.**

La o concentrație de 0,5 mM de Eug a indus condensarea cromatinei și o reducere a dimensiunii nucleelor în celulele de carcinom colorectal. În plus, au fost observate corpuri apoptotice. Pe lângă aceasta, Eug a determinat o serie de modificări care apar la nivelul filamentelor de actină, precum condensarea și reorganizarea lor în inele periferice.

În partea a doua a aceluiași capitol a fost analizat profilul de siguranță al materialelor dentare pentru a confirma aplicabilitatea protocoalelor in vitro. Materialele ceramice s-au dovedit a fi eficiente în reconstrucția osoasă datorită biocompatibilității, disponibilității și asemănării lor strânse cu componentele osoase anorganice [6]. Până în prezent, există puține dovezi ale unei legături între implanturile dentare și carcinoamele orale [7]. Astfel, studiul de față a fost conceput pentru a evalua două tipuri de ceramică, obținute din Ceramco iC Natural DentineDentsply Sirona (P1) și Ceramco iC Natural Enamel, Dentsply Sirona (P2), respectiv la nivelul liniei celulare de cancer faringian Detroit 562. După 72 de ore de stimulare cu cinci concentrații (5, 10, 25, 50 și 75 μg/mL), efectul probelor ceramice (P1 și P2) suspendate în salivă artificială la trei valori ale pH-ului (acid, neutru și bazic) pe celulele canceroase faringiene a fost determinat (Figura 10).

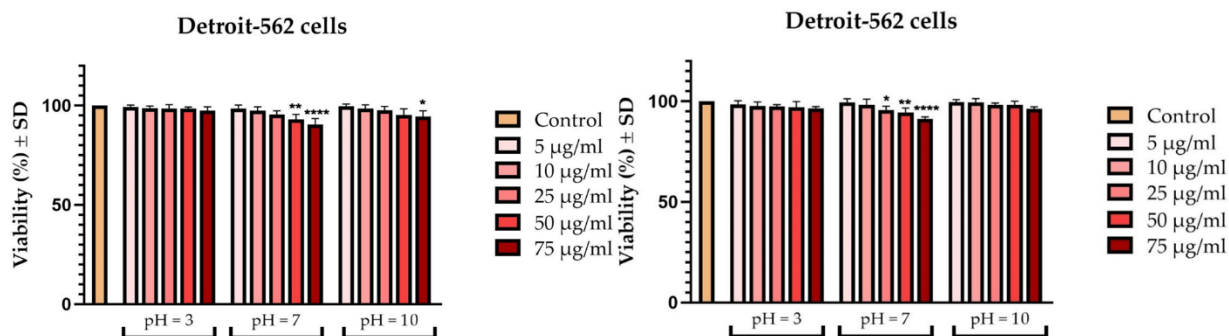


Figura 10. Evaluarea in vitro a efectului P1 (stânga)/P2 (dreapta) (5, 10, 25, 50 și 75 µg/mL) suspendate în salivă artificială cu pH acid (pH = 3), pH neutru (pH = 7) și pH bazic (pH = 10) la nivelul liniei celulare Detroit-562 după 72 de ore de tratament.

Pentru a evalua influența celor două probe ceramice asupra migrării celulelor canceroase faringiene, s-a aplicat metoda de vindecare a rănilor, în care două concentrații (5 și 75 µg/mL) au fost suspendate în trei tipuri de salivă cu valori ale pH-ului variate pentru analiză. Dintre concentrațiile testate, 75 µg/mL la pH 7 a arătat cea mai puternică inhibare a migrației celulare. P2 a inhibat de asemenea migrația, dar această inhibare a fost mai puțin pronunțată în comparație cu P1 (Figura 11).

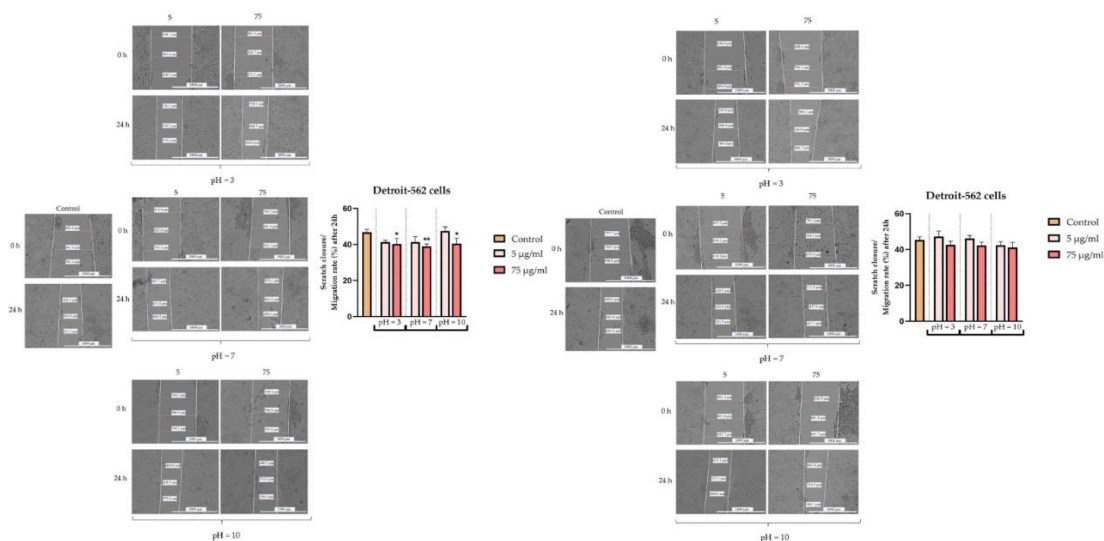
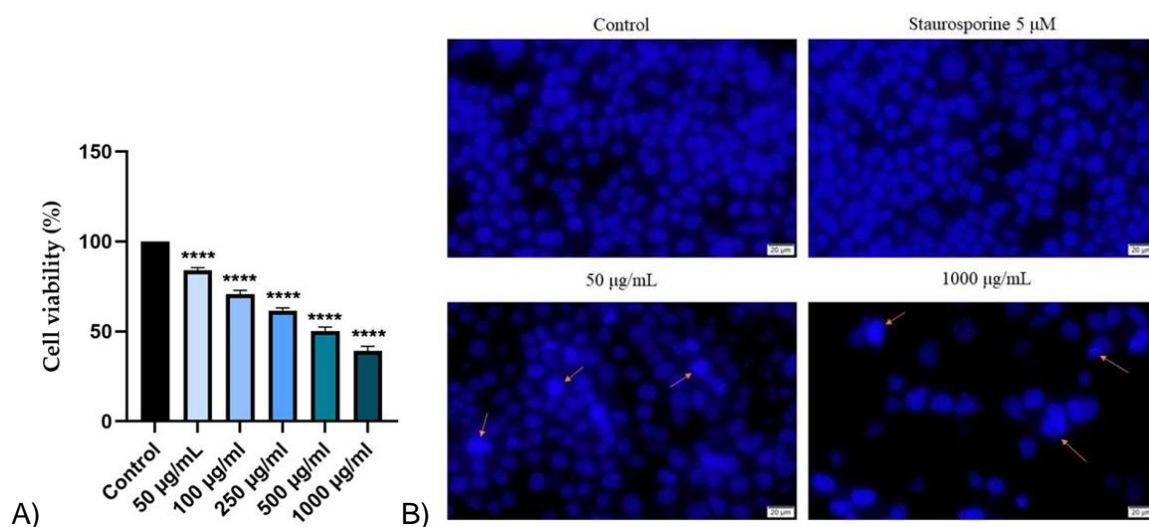


Figure 11. Rata de închidere a răni în cazul celulelor Detroit-562 după tratamentul cu P1 (stânga) și P2 (dreapta) (5 și 75 µg/mL) în salivă artificială cu trei tipuri de pH (acid, neutru și bazic). Graficele cu bare sunt prezentate ca procent de închidere a plăgii după 24 de ore în comparație cu suprafața inițială.

Următorul studiu a evidențiat impactul extractului hidroalcoolic de *Viscum album* (VAex), despre care se știe că este eficient asupra cancerului oral, asupra a două linii celulare canceroase de piele: carcinomul epidermoid cutanat – A431, un cancer scuamos, precum și asupra unui melanom murin – B164A5 și, de asemenea, pe o linie celulară de keratinocite umane sănătoase.



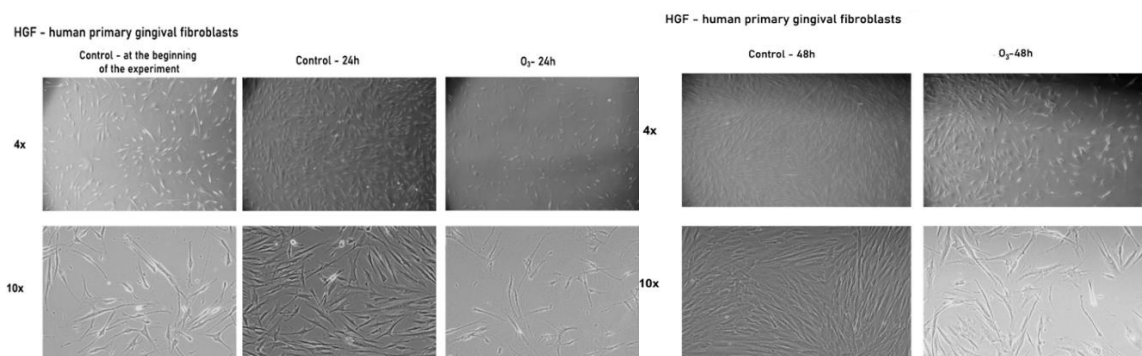
În ceea ce privește efectul VAex, cel mai semnificativ efect a fost observat asupra A431, unde s-a văzut o scădere a viabilității celulare de la 50  $\mu\text{g/mL}$  (aproximativ 83%). Și în acest caz, concentrația cea mai citotoxică a fost de 1000  $\mu\text{g/mL}$ , unde valoarea viabilității a fost de aproximativ 39% (Figura 9). În plus, VAex manifestă un efect puternic asupra nucleilor celulelor de carcinom cutanat scuamos (Figura 12).



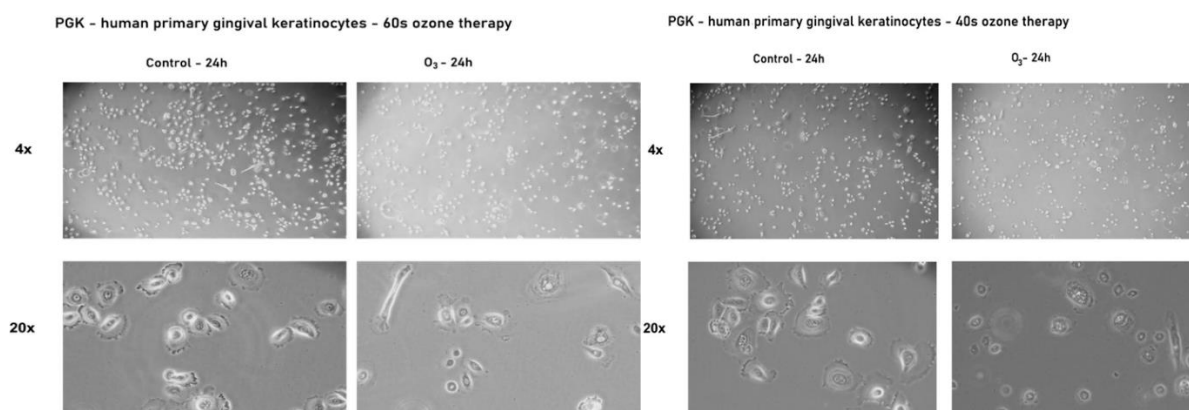
**Figura 12.** A) Evaluarea in vitro a efectului VAex (50, 100, 250, 500 și 1000  $\mu\text{g/mL}$ ) asupra viabilității celulelor de carcinom epidermoid cutanat (A431) după 24 de ore de tratament. B) Carcinom cu celule scuamoase ale pielii – nucleii A431 colorați cu Hoechst 33342 după un tratament de 24 de ore cu VAex (50 și 1000  $\mu\text{g/mL}$ ). Staurosporina (5  $\mu\text{M}$ ) a fost utilizată ca control pozitiv pentru modificările apoptotice la nivel nuclear. Săgețile portocalii indică semne de apoptoză.

Ultimul studiu (pornind de la premisa că ozonoterapia bio-oxidativă reduce numărul de bacterii), își propune să evalueze impactul ozonoterapiei gazoase asupra morfologiei și confluentei celulelor gingivale umane primare: keratinocite (PGK) și fibroblaste (HGF).

O singură expunere la ozon timp de 20 de secunde a indus modificări semnificative în morfologia și confluentea fibroblastelor atât la 24, cât și la 48 de ore post-expunere (Figura 12), care au fost după cum urmează: confluentea a fost foarte scăzută la 24 de ore după expunere, iar celulele, deși încă aderente la placă, prezentau o formă diferită (erau mult mai alungite și aveau un fel de vezicule la suprafață; la 48 de ore după expunerea la ozon, fibroblastele au început să-și recapete morfologia inițială, asemănătoare cu cea prezentată). S-a observat și o creștere a confluentei față de cele de la expunerea de 24 h, dar a fost totuși mai mică decât cea a celulelor de control. Nu s-au observat modificări semnificative în morfologia și confluentea celulelor în cazul keratinocitelor gingivale la acest interval. După cum se poate observa în figura 13, expunerea la ozon pentru perioade mai lungi – 40 și 60 s – a dus la o scădere a confluentei keratinocitelor și chiar la prezența celulelor plutitoare în mediul de cultură. Unele modificări ale morfologiei similare celor observate în fibroblaste au fost identificate, dar nu au fost la fel de intense.



**Figura 16. Aspectul microscopic al fibroblastelor gingivale primare—HGF în cultură la 24/48 ore după expunerea la ozon gazos timp de 20 s. Pozele au fost realizate cu lentile de 4x și 10x.**



**Figura 17. Aspectul microscopic al keratinocitelor gingivale primare—PGK la 24 de ore după expunerea la ozon gazos timp de 40 și 60 s. Pozele au fost realizate cu lentile de 4x și 20x.**

## Concluzii

Primul studiu s-a concentrat pe evaluarea efectului citotoxic in vitro al Eug, asupra celulelor de carcinom bucal scuamos, precum și la nivelul fibroblastelor gingivale umane. Conform rezultatelor, Eug inhibă celulele de carcinom scuamos al limbii într-o manieră dependentă de doză. În plus, efectul citotoxic a fost asociat cu apariția unor modificări asemănătoare apoptotice în morfologia celulei, precum și în nucleele și structurile citoscheletului. În plus, tratamentul cu Eug al celulelor SCC-4 a dus la o creștere a expresiei markerilor pro-apoptotici - Bax și Bad.

În a doua cercetare, potențialul citotoxic al Eug a fost evaluat și analizat cu privire la celulele de carcinom colorectal. Ca rezultat al studiilor, Eug inhibă proliferarea celulelor de carcinom colorectal într-o manieră dependentă de doză. Au fost observate și o serie de modificări morfologice ca urmare a efectului citotoxic - rotunjirea celulelor, condensarea nucleelor și reorganizarea filamentelor de actină. Când protocoalele in vitro au fost aplicate pe ceramice, rezultatele au arătat că cele două materiale ceramice testate (P1 și P2) nu au prezentat efecte pro-tumorale evidente asupra liniei de celule canceroase faringiene Detroit-562.

În cel de-al treilea studiu, sa constatat că VAex este citotoxic pentru celulele melanomului pigmentate și nepigmentate într-o manieră dependentă de doză. Ca urmare, 24 de ore de

stimulare au condus la o scădere a confluenței celulare, în timp ce, în același timp, s-au observat modificări morfologice în nucleul celulelor, sugerând un efect asemănător apoptotic. O constatare demnă de remarcat a studiului a fost că VAex este mai citotoxic pentru celulele nepigmentate (A431) decât pentru celulele pigmentate (B164A5), evidențiind selectivitatea în celulele scuamoase.

În ultimul studiu, ozonoterapia biologică, care poate fi folosită ca măsură comună pentru prevenirea cariilor dentare, pentru a scoate dintele din zona de risc, pentru a reduce placa bacteriană din carii și fisuri și pentru a crea premisele remineralizării smalțului, a fost testată. Modul de aplicare a utilizării ozonului este ușor și non-invaziv, fără contraindicații majore și a fost acceptat de toți pacienții incluși în studiu. În urma ozonoterapia bio-oxidativă s-a constatat o îmbunătățire a calității smalțului cu modificări semnificative ale valorilor de demineralizare a țesutului dentar, de la valori inițiale echivalente de demineralizare a smalțului la valori care corespundeau cu cele ale smalțului integral, fără riscul unui proces carios. În plus, prezentul studiu a arătat că expunerea la 20, 40 și 60 s de ozon a determinat un răspuns dependent de tipul celular, după cum urmează: keratinocitele gingivale (care formează stratul exterior al gingiei) au fost afectate (modificări ale morfologiei celulelor și o confluență redusă) de către ozon după doar 60 s de expunere, în timp ce în cazul fibroblastelor gingivale, modificările morfologice au fost observate la cel mai scurt interval de expunere— 20 s. Aceste date evidențiază o susceptibilitate crescută a fibroblastelor gingivale la toxicitatea ozonului gazos în comparație cu keratinocite și ar putea fi folosite ca fundal pentru studii ulterioare privind efectele nocive ale ozonului.

Studiile experimentale efectuate reflectă contribuții originale care completează în principal datele existente privind profilul terapeutic al compușilor naturali cu importanță semnificativă în stomatologie și lărgesc spectrul de siguranță atât al compușilor naturali, cât și al celor clasici utilizați în stomatologie.

Pe viitor, propunem integrarea compușilor naturali în formule inovatoare (nanostructuri) pentru creșterea potențialului lor terapeutic și includerea ulterioară a acestora în formulări finite, cu uz stomatologic.



## Bibliografie

1. Zhang LW, Li J, Cong X, Hu XS, Li D, Wu LL, et al. Incidence and mortality trends in oral and oropharyngeal cancers in China, 2005–2013. *Cancer Epidemiology* 2018;57:120-126.
2. Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral oncology* 2009;45(4-5):309-316.
3. Mittal M, Gupta N, Parashar P, Mehra V, Khatri M. Phytochemical evaluation and pharmacological activity of *Syzygium aromaticum*: a comprehensive review. *Int J Pharm Pharm Sci.* 2014;6(8):67–72.
4. Mohammadi Nejad S, Özgüneş H, Başaran N. Pharmacological and Toxicological Properties of Eugenol. *Turkish J Pharm Sci.* 2017;14(2):201–206.
5. Zari AT, Zari TA, Hakeem KR. Anticancer properties of eugenol: A review. *Molecules* 2021;26(23), 7407.
6. Asa'ad F, Pagni G, Pilipchuk SP, Gianni AB, Giannobile WV, Rasperini G. 3D-Printed Scaffolds and Biomaterials: Review of Alveolar Bone Augmentation and Periodontal Regeneration Applications. *Int. J. Dent* 2016; 2016, 1239842.
7. Dutta SR, Passi D, Singh P, Atri M, Mohan S, Sharma, A. Risks and Complications Associated with Dental Implant Failure: Critical Update. *Natl. J. Maxillofac. Surg* 2020; 11, 14–19.