

MEMORIU STIINTIFIC ASUPRA TEZEI DE DOCTORAT
“ASPECTE EXPERIMENTALE PRECLINICE RELEVANTE ÎN
PRACTICA DENTARĂ”

Elaborată de Drd. Alexandra-Ioana POP (DĂNILĂ), sub coordonarea
științifică a Prof.Univ.Dr. Mihai ROMÎNU

1. Motivarea cercetării

Protocoloalele de desinfecție în cabinetele dentare sunt foarte importante, deoarece previn transmiterea agenților infecțioși, iar educația și formarea continuă a profesioniștilor dentari privind metodele de desinfecție reprezintă componente esențiale ale unei practici dentare eficiente, împreună cu menținerea standardelor de igienă ridicate. Dezinfecțanții sunt esențiali în diverse proceduri dentare, de la dezinfectarea amprentelor dentare la tratamentul bolilor orale, iar eficacitatea lor este influențată în primul rând de natura dezinfectantului și de concentrația acestuia. Mulți dezinfecțanți sunt disponibili sub formă de compuși individuali sau în combinații, ceea ce le sporește spectrul antimicrobian și eficacitatea. Mai mult, eficacitatea dezinfecțanților bucali mai depinde și de metodele de aplicare în practica dentară. Alegerea de către profesionistul dentar a unor protocoale adecvate de aplicare a dezinfecțanților dentari (inclusiv durata de expunere și concentrația dezinfectantului), sunt esențiale pentru obținerea unor rezultate optime. Practicile de dezinfecție inadecvate pot duce la o contaminare microbiană persistentă, prezentând riscuri atât pentru pacienți, cât și pentru medicii stomatologi. Prin urmare, respectarea protocoalelor standardizate de dezinfecție este esențială pentru asigurarea siguranței și eficacității tratamentelor dentare.

În prezenta teză de doctorat, am ales să investigăm unul dintre cei mai utilizați dezinfecțanți în practica dentară - clorhexidina (CHX), a cărei eficacitate se extinde dincolo de proprietățile sale antibacteriene. Utilizarea clorhexidinei joacă un rol crucial în reducerea contaminării mediului în cadrul cabinetelor dentare. Eficacitatea sa împotriva unui spectru larg de microorganisme, inclusiv bacterii Gram-pozitive și Gram-negative, precum și ciuperci, subliniază utilitatea sa în diverse aplicații dentare. Mecanismul de acțiune al clorhexidinei implică perturbarea membranelor celulare microbiene, ducând la liza și moartea celulelor, care este deosebit de eficientă împotriva tulpinilor rezistente, cum ar fi *Enterococcus faecalis*, un agent patogen comun în infecțiile

endodontice. Cu toate acestea, în ciuda numeroaselor sale avantaje, utilizarea clorhexidinei nu este lipsită de dezavantaje. Un alt compus studiat în teză a fost eugenolul, utilizat pe scară largă în practica stomatologică datorită proprietăților sale farmacologice. Caracteristicile sale analgezice, antiinflamatorii, antimicrobiene și antifungice îl fac un agent valoros în diverse aplicații dentare. Eugenolul prezintă o activitate antimicrobiană cu spectru larg împotriva diferiților agenți patogeni bucali, inclusiv *Streptococcus mutans* și speciile *Candida*. Această acțiune antimicrobiană este deosebit de valoroasă în prevenirea infecțiilor secundare în cadrul procedurilor dentare și în gestionarea bolilor orale. Efectele antiinflamatoare ale eugenolului contribuie la utilitatea acestuia în gestionarea durerii și inflamației dentare, făcându-l un element de bază în practica stomatologică. Totuși, în ciuda avantajelor sale, utilizarea eugenolului prezintă anumite preocupări. Eugenolul prezintă efecte citotoxice la anumite concentrații, în special asupra fibroblastelor pulpei dentare umane. Această citotoxicitate este un aspect critic pentru medicii stomatologi, deoarece poate duce la reacții adverse la pacienți, inclusiv iritație localizată, dermatită alergică de contact și, în cazuri rare, reacții anafilactice. De aceea, este imperativ necesar ca echilibrul dintre beneficiile terapeutice ale eugenolului și toxicitatea sa potențială necesită o analiză atentă a concentrației și aplicării sale în contexte clinice. Aceste reacții pot varia de la iritații localizate la reacții sistemice mai severe, necesitând precauție în aplicarea sa. În plus, în timp ce eugenolul este în general sigur la concentrații terapeutice, doze mai mari au fost asociate cu efecte citotoxice asupra fibroblastelor din pulpa dentară umană, ridicând îngrijorări cu privire la utilizarea sa pe termen lung în tratamentele dentare.

Nanotehnologia a revoluționat industria farmaceutică permițând dezvoltarea sisteme purtătoare de agenți terapeutici. Aceste sisteme sunt concepute pentru a îmbunătăți eficiența administrării medicamentelor sau a diversilor agenți cu acțiune terapeutică, prin creșterea penetrării lor prin barierele biologice. Nanosistemele solide au apărut ca un progres semnificativ în tehnologiile de administrare a medicamentelor. Unul dintre nanosistemele solide utilizate în domeniul biomedical este reprezentat de nanoparticulele de oxizi de fier. Modificarea suprafeței nanoparticulelor de oxid de fier este un aspect critic al clasificării și aplicării lor în stomatologie. Acoperirea acestor nanoparticule cu diverși agenți terapeutici activi, poate spori semnificativ stabilitatea lor, poate reduce toxicitatea agenților utilizați și poate îmbunătăți interacțiunea lor cu sistemele biologice. În plus, încorporarea agenților antimicrobieni în suprafața nanoparticulelor de

oxid de fier poate oferi o funcționalitate dublă, oferind atât efecte terapeutice, cât și proprietăți materiale îmbunătățite pentru aplicații dentare.

Prin urmare, în contextul de mai sus, teza de doctorat face parte din tema de cercetare referitoare la prepararea unei matrice solide de tip nano-purtătoare utilizată ca suport pentru administrarea a două tipuri de dezinfectanți bucali (eugenol și clorohexidină), pentru a spori efectul terapeutic al acestora și a reduce efectele secundare adverse pe care le pot exercita cei doi dezinfectanți, mai ales dacă sunt utilizați în concentrații mari. Nanoparticulele sintetizate, utilizate ca matrice purtătoare, precum și întregul nanosistem încorporat cu dezinfectanți bucali vor fi caracterizate și investigate în continuare din punct de vedere al posibilelor sale aplicații biomedicale în practica stomatologică. Ca matrice purtătoare, am decis să sintetizăm și să caracterizăm două tipuri de nanoparticule de oxid de fier - și anume maghemite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) și hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$), deoarece aceste oxizi de fier sunt biocompatibile, posedă proprietăți antibacteriene, sunt stabile chimic, ceea ce le face materiale fiabile pentru diferite proceduri dentare.

2. Lista de lucrări care fac parte integrantă din teza de doctorat

1. **Alexandra-Ioana Dănilă**, Stefania Dinu, Daniel Pop, Malina Popa, Ramona Amina Popovici, Mihai Rominu, Mhd Kher Alsaeyd Ahmad, Dana Emanuela Pitic(Coț), Dana Cristina Bratu. Characterization and Biosafety Profile of Eugenol Incorporated in Iron Oxide Nanoparticles. Romanian Journal of Oral Rehabilitation (2024), 16(3), 442-452. <https://doi.org/10.6261/RJOR.2024.3.16.46> (I.F.=0.7)
2. Daniel Breban-Schwarzkopf, **Alexandra-Ioana Danila**, Alina Doina Tanase, Krisztina Munteanu, Diana Haj Ali, Ramona Popovici, Camelia Szuhaneck, Mihai Rominu. Eugenol - a natural alternative in dentistry: an in vitro and in ovo biosafety assessment. Farmacia (2024), 72(5), 1011-1018. <https://doi.org/10.31925/farmacia.2024.5.4> (I.F.=1.4)
3. **Alexandra-Ioana Dănilă**, Mihai Romînu, Krisztina Munteanu, Elena-Alina Moacă, Andreea Geamantan-Sîrbu, Iustin Olariu, Diana Marian, Teodora Olariu, Ioana-Cristina Talpoș-Niculescu, Raluca Mioara Cosoroabă, Ramona Popovici, Ștefania Dinu. Development of solid nanosystem for delivery of chlorhexidine with increased antimicrobial activity and decreased cytotoxicity: characterization, in vitro and in ovo toxicological screening. Molecules (2025), 30(1), 162-195. <https://doi.org/10.3390/molecules30010162> (I.F.=4.2)

3. Date despre evoluția cercetării

Scopul teze de doctorat a fost sinteza, caracterizarea și evaluarea biologică a unui nanosistem solid pentru administrarea de eugenol și clorhexidină, două tipuri de dezinfectanți bucali, în vederea minimizării toxicității acestora, maximizând în același timp eficacitatea lor antimicrobiană, prin efectuarea unui screening toxicologic in vitro și in ovo.

Prin urmare, activitățile întreprinse pentru atingerea scopului tezei, au constat în:

a) proiectarea, caracterizarea și evaluarea in vitro a unor nanoparticulelor de oxid de fier (hematită) cu EUG încorporat pe suprafață (NP@EUG), pe o linie celulară sănătoasă (JB6 Cl 105 41-5a – linie celulară de epiderm murinic) și analiza rezultatelor în comparație cu efectele produse doar de EUG, precum și de nanoparticulele goale pentru a observa dacă citotoxicitatea EUG poate fi redusă prin încorporarea lui în matrici solide.

Rezultatele obținute au arătat că, examinarea biologică a nanosistemului solid preparat a indicat un profil bun de biosecuritate atunci când celulele de epiderm murinic (JB6 Cl 41-5a) au fost expuse la concentrația maximă de nanoparticule de oxid de fier (100 $\mu\text{g/mL}$). În ceea ce privește nano-formularea preparată (EUG încorporat pe suprafața nanosistemului solid), rezultatelor obținute din experimentele in vitro, au arătat că, proba NPs@EUG pare să reducă citotoxicitatea EUG asupra celulelor epidermice, acțiuni evidențiate de o viabilitate celulară mai mare în urma tratamentului cu NPs@EUG comparativ cu EUG singur, cu mai puține modificări morfologice și pierderi mai mici de lactat dehidrogenază (LDH), reprezentând o alternativă pentru administrarea eugenolului, cu un profil de siguranță îmbunătățit pentru aplicații medicale.

b) sinteza și caracterizarea CHX încapsulată pe suprafața nanoparticulelor de maghemită (CHX-NPS), pentru a minimiza toxicitatea CHX, maximizând în același timp eficacitatea ei terapeutică. Noul nanosistem magnetic obținut a fost caracterizat prin metode fizico-chimice, cum ar fi spectroscopia în infraroșu cu transformată Fourier (FT-IR) - pentru a identifica moleculele funcționale de clorhexidină încorporate pe suprafața nanoparticulelor de maghemită; precum și microscopia electronică (de scanare și transmisie) - pentru a investiga morfologia și ultrastructura nanosistemului magnetic.

Rezultatele acestui studiu au arătat că, noul nanosistem dezvoltat ar putea fi utilizat în domeniul stomatologiei și al utilizării maghemitei ca sistem purtător de medicamente. Proprietățile unice ale nanoparticulelor de maghemită, inclusiv superparamagnetismul și biocompatibilitatea, le

transformă în candidați ideali pentru aplicațiile privind administrarea direcționată a medicamentelor.

În ceea ce privește clorhexidina, aceasta rămâne o piatră de temelie în prevenirea infecțiilor în cadrele medicale, în special în gestionarea igienei orale pentru pacienții grav bolnavi, dar sunt necesare cercetări continue pentru a optimiza utilizarea sa, pentru a aborda potențialele efecte adverse, în special în aplicațiile pe termen lung, și pentru a se asigura că furnizorii de asistență medicală sunt echipați cu cunoștințele necesare pentru a pune în aplicare protocoale eficiente de îngrijire orală.

c) evaluarea unui screening toxicologic in vitro și in ovo, demonstrând astfel versatilitatea suportului solid pe bază de nanoparticule de maghemită obținut, care îmbunătățește biodisponibilitatea clorhexidinei. Modelele in vitro utilizate în acest studiu au fost două linii celulare sănătoase: keratinocite umane imortalizate HaCaT și celule epidermice murinice JB6 Cl 41-5a la 24 h după expunerea lor la nanoparticulele de maghemită, nanosistemul CHX-NPS și soluție de CHX 2% (o concentrație destul de ridicată în comparație cu cele raportate în literatura științifică), pentru intervale scurte. Screeningul in ovo a fost evaluat cu ajutorul testului HET-CAM (Hen's Egg-Chorioallantoic Membrane) pentru a investiga dacă probele de testare prezintă vreun potențial efect iritant asupra membrane corioalantoice ale oului de găină embrionat.

După caracterizarea nanosistemului CHX-NPS sintetizat prin spectroscopie FTIR și microscopie electronică, rezultatele in vitro au arătat că eficacitatea antimicrobiană a CHX a fost îmbunătățită atunci când a fost administrată printr-un sistem la scară nanometrică, cu biodisponibilitate îmbunătățită și toxicitate redusă atunci când a fost testat noul nanosistem CHX-NPS. Screeningul in ovo a arătat că nanosistemul CHX-NPS nu a provocat niciun semn de iritare asupra vasculaturii membranei corioalantoice și a fost clasificat ca substanță neiritantă. În ciuda acestui fapt, cercetările viitoare ar trebui să se concentreze pe optimizarea acestui tip de nanosistem și pe efectuarea unor studii in vivo cuprinzătoare pentru validarea eficacității și siguranței lor terapeutice în contexte clinice.

Prin urmare, putem spune că, constatările obținute în acest studiu, întăresc afirmația referitoare la faptul că sistemul de nano-transport sintetizat compus din soluție de CHX încorporată pe suprafața nanoparticulelor magnetice de oxid de fier ar putea fi utilizat în domeniul stomatologiei, iar utilizarea maghemitei ca sistem purtător de medicamente, poate fi considerată ca o abordare pentru terapia agenților patogeni bucali, datorită caracteristicilor lor fizico-chimice.

Direcțiile viitoare de cercetare se vor axa pe optimizarea formulărilor care vizează îmbunătățirea rezultatelor pentru pacienți, reducând în același timp la minimum efectele adverse ale CHX, prin utilizarea nanoparticulelor de oxid de fier și funcționalizarea suprafeței acestora. pentru a spori biocompatibilitatea și pentru a reduce potențialele efecte secundare asociate cu utilizarea lor.

Noua formulă bazată pe nanoparticule de oxid de fier a fost concepută pentru a oferi o acțiune antimicrobiană eficientă cu citotoxicitate in vitro redusă asupra liniilor celulare sănătoase. În conformitate cu această afirmație, am demonstrat în studiul de față că nanosistemul CHX-NPS a prezentat proprietăți bacteriostatice și bactericide îmbunătățite împotriva *E. coli*, *S. aureus* și *P. aeruginosa*, comparativ cu soluția CHX, testată la aceleași concentrații ca și nanosistemul sintetizat. În concluzie, evaluarea in vitro a nanosistemelor purtătoare de clorhexidină care utilizează nanoparticule de oxid de fier prezintă o strategie promițătoare pentru creșterea eficacității acestui agent antimicrobian.

4. Aprecierea conducătorului de doctorat în ceea ce privește datele științifice din teză

Din analiza de ansamblu a tezei de doctorat elaborată de Drd. Alexandra-Ioana Pop (Dănilă), consider că lucrarea se încadrează într-o tematică de cercetare complexă, privind utilizarea nanotehnologiei în stomatologie, prin sintetizarea unor nanosisteme pe bază de nanoparticule de oxizi de fier (hematită și maghemită), biocompatibile, cu suprafață adecvată pentru atasarea a doi dezinfectanți utilizați în practica dentară, clorhexidina și eugenolul.

Noutatea acestei teze de doctorat constă în faptul că cercetarea de față aduce o contribuție importantă în direcția dezinfectanților bucali, în special a clorhexidinei, și a eugenolului, care sunt cunoscuți pentru potențialele lor efecte secundare, mai ales atunci când sunt utilizați la concentrații mari. Un alt aspect demn de noutate este reprezentat de nanosistemul purtător, în sensul că pentru prima dată în literatura de specialitate au fost utilizate nanoparticule de hematită ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$), alături de nanoparticule de maghemită ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) pentru transportul celor doi dezinfectanți investigați. Diferența dintre acestea constă în faptul că nanoparticulele de hematită sunt slab feromagnetice sau cu proprietăți antiferomagnetice, dar dintre toți oxizii de fier, acesta este cel mai stabil din punct de vedere chimic și termodinamic la temperatura camerei. Prin urmare, maghemita și hematita au fost utilizate în prezenta teză de doctorat ca un sistem purtător pentru a

furniza clorohexidina și eugenolul în cavitatea bucală, fără apariția altor potențiale efecte secundare, dar cu proprietăți terapeutice îmbunătățite.

La sfârșitul experimentelor, doctoranda a demonstrat versatilitatea nanosistemului purtător cu dezinfectanți, prin faptul că a demonstrat că acesta îmbunătățește biodisponibilitatea clorhexidinei și eugenolului.

Cercetările viitoare ar trebui să se concentreze pe optimizarea formulării acestui sistem purtător și a mecanismelor de livrare a dezinfectanților sau a altor compuși utilizați în stomatologie, pentru a maximiza potențialul lor terapeutic, a minimiza efectele toxice adverse, asigurând în același timp siguranța și eficacitatea utilizării lor în cadrul clinic.

Teza de doctorat a fost concepută și redactată în conformitate cu rigorile impuse de către Universitatea de Medicină și Farmacie “Victor Babeș” din Timișoara, doctoranda arătând un caracter matur și profesionalism în domeniul științific datorită seriozității și a muncii depuse în rezolvarea cu succes a obiectivelor propuse. Mai mult, doctoranda a arătat că stăpânește tehnica experimentală, inclusiv tehnici de prelucrare și interpretare a rezultatelor obținute, raportându-se constant la datele existente în literatura de specialitate. Rezultatele originale ale tezei au fost publicate în reviste indexate și cotate ISI Thompson Reuters, cu un factor de impact cumulat de 6.3, fapt ce confirmă importanța acestora.

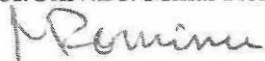
În concluzie consider că teza de doctorat îndeplinește condițiile cerute unui doctorat pentru domeniul „Medicină Dentară”.

Data

30.04.2025

Conducător de doctorat

Prof.Univ.Dr. Mihai Romînu



Doctorand

Alexandra-Ioana Pop (Dănilă)

