
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Experimentări complexe asupra efectelor intervențiilor nonchirurgicale în parodontite

Doctorand **Sofia Iozon (Ene)**

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



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	13
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	
1. Aspecte nosologice asociate parodontitei. Parodontiul	19
1.1. Date actuale și elemente de comparație cu vechea clasificare	19
1.2. Noțiuni actualizate de structură a parodontiului	22
1.2.1. Aspect structural de ansamblu	22
1.2.2. Interfața de adeziune epitelio-conjunctivă a gingiei	25
2. Tratamente avansate în managementul afecțiunilor parodontale	27
2.1. Celule stem mezenchimale de origine orală	27
2.1.1. Celule stem – aspecte generale	27
2.1.2. Surse de celule stem în cavitatea orală	28
2.1.3. Aplicații ale celulelor stem în medicina dentară	30
2.2. Concentrate plachetare utilizate în terapia parodontală	32
2.2.1. Evoluția tipurilor de concentrate plachetare	32
2.2.2. Proprietăți biologice ale concentratelor plachetare	34
2.2.3. Aplicabilitatea clinică a concentratelor plachetare în parodontologie	36
3. Substanțe antiseptice adjuvante utilizate în terapia parodontitelor	37
3.1. Tratamente adjuvante în terapia parodontală nonchirurgicală	37
3.2. Substanțe antiseptice	38
3.2.1. Povidone iodina	38
3.2.2. Nanoparticule de argint	38
3.3. Lactoferina	39
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	
1. Ipoteza de lucru și obiective	45
2. Metodologie generală	47
3. Studiul 1 - Influența unui concentrat plachetar (iPRF) asupra comportamentului celulelor stem mezenchimale gingivale	49
3.1. Introducere	49
3.2. Ipoteza de lucru	51

3.3. Material și metodă	52
3.4. Rezultate	59
3.5. Discuții	67
3.6. Concluzii	72
4. Studiul 2 - Evaluări ale modificărilor suprafețelor radiculare produse de diferite tipuri de instrumentare mecanică subgingivală – un studiu <i>in vitro</i>	73
4.1. Introducere	73
4.2. Ipoteza de lucru	75
4.3. Material și metodă	75
4.4. Rezultate	79
4.5. Discuții	83
4.6. Concluzii	85
5. Studiul 3 - Utilitatea unui preparat antiseptic pe bază de argint nanocoloidal ca adjuvant local în tratamentul nonchirurgical al parodontitelor: un studiu clinic randomizat de tip split-mouth	87
5.1. Introducere	87
5.2. Ipoteza de lucru	89
5.3. Material și metodă	90
5.4. Rezultate	97
5.5. Discuții	104
5.6. Concluzii	108
6. Concluzii generale	109
7. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	113
REFERINȚE	115

Cuvinte cheie: parodontită, celule stem mezenchimale gingivale, concentrat plachetar, instrumentare mecanică subgingivală, substanțe antiseptice adjuvante

INTRODUCERE

Parodontita este o afecțiune infecțioasă-inflamatorie a țesuturilor de susținere ale dinților în cavitatea orală, cu prevalență ridicată în populație. Atitudinea terapeutică în parodontită este centrată pe îndepărtarea factorului etiologic primar, și anume biofilmul bacterian subgingival. Instrumentarea mecanică subgingivală este standardul de aur în tratamentul parodontitei, însă există situații clinice în care aceasta nu este suficientă pentru oprirea evoluției leziunilor și stabilizarea bolii. Utilizarea preparatelor adjuvante cu efect antimicrobian a dus la rezultate clinice inconsistente. Diverse biomateriale au fost manipulate în vederea obținerii unei vindecări parodontale satisfăcătoare după intervenții chirurgicale sau nonchirurgicale, însă de asemenea cu rezultate inconstante.

Prezenta teză de doctorat este structurată în două părți. *Stadiul actual al cunoașterii* cuprinde trei capitole care fac o trecere în revistă a noțiunilor din literatura de specialitate privitoare la structura parodontiului, sistemele de clasificare ale parodontitei, tratamente avansate în terapia parodontală și substanțe antiseptice adjuvante utilizate în parodontologie. Cea de-a doua parte, *Contribuțiile personale*, include trei studii, două *in vitro* și unul clinic, și investighează influența unui concentrat plachetar asupra celulelor stem mezenchimale gingivale, modificările suprafeței radiculare după tratamente mecanice și chimice, precum și impactul clinic al unui produs antiseptic adjuvant local.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

1. Aspecte nosologice asociate parodontitei. Parodontiul

De-a lungul timpului, sistemul de clasificare al afecțiunilor parodontale a fost modificat în funcție de evoluția dovezilor științifice și aplicabilitatea lor clinică. Sistemele vechi diferențiau formele de parodontită în funcție de vârsta pacientului și concordanța acesteia cu gradul de distrucție al țesuturilor. Cel mai recent sistem de clasificare include însă afecțiunile cu pierdere interdentară de atașament în clasa mare de „parodontite”, manifestările clinice variabile fiind datorate susceptibilității și gradului de expunere diferite din populație.

Parodontiul este un organ înalt specializat, format din patru țesuturi: mucoasa gingivală, ligamentul parodontal, cementul radicular și osul alveolar. Datorită

complexității structurale, vindecarea plăgilor parodontale presupune „recapitularea” fenomenelor din cursul morfogenezei, pe baza combinației și secvenței favorabile de biomolecule reglatoare, celule progenitoare, matrice extracelulară de suport și aport sangvin. Restaurarea formei și funcției țesuturilor parodontale pierdute datorită parodontitei este un deziderat dificil de atins, cu toată evoluția materialelor și metodelor de manipulare ale acestora.

2. Tratamente avansate în managementul afecțiunilor parodontale

În funcție de originea lor, celulele stem au capacități proliferative și potențial de diferențiere diferit. Cavitatea orală este o sursă abundentă de celule stem, ele putând fi izolate din diverse structuri: pulpa dinților temporari sau permanenți, ligament parodontal, folicul dentar, papilă apicală sau țesut gingival. Prin investigații *in vitro*, manipularea acestor celule stem a dus la diferite rezultate în termeni de regenerare a țesuturilor din cavitatea orală.

Concentratele plachetare sunt preparate obținute din sânge centrifugat prin diverse protocoale. Ele au o largă utilizare în tehnicile chirurgicale și nonchirurgicale datorită proprietăților lor biologice: îmbunătățirea vindecării prin accelerarea procesului și ameliorarea simptomatologiei, rol angiogenetic și antibacterian, aport de factori de creștere și celule imunitare, stimularea populațiilor locale de celule progenitoare.

3. Substanțe antiseptice adjuvante utilizate în terapia parodontitelor

În cazurile de parodontită medie sau severă, cu pungi parodontale adânci sau alți factori de complexitate locală sau sistemică, instrumentarea mecanică subgingivală pare să fie insuficientă pentru tratarea și stabilizarea bolii. Astfel se justifică indicația utilizării adjuvante de diverse preparate cu administrare locală sau sistemică pentru eliminarea bacteriilor reziduale sau pentru modularea răspunsului imun al organismului gazdă. Ghidurile terapeutice recente nu indică o substanță antiseptică aplicată local (fie sub formă de irigații subgingivale, fie ca produs cu eliberare prelungită) care să fie eficientă în toate situațiile clinice și să aducă beneficii clinice suplimentare față de instrumentarea mecanică subgingivală.

Povidone iodina este un antiseptic cu spectru larg de acțiune, eficientă *in vitro* împotriva bacteriilor parodontopatogene, dar fără dovezi clare ale beneficiului clinic adițional al utilizării ei în terapia parodontală. Nanoparticulele de argint au proprietăți antibacteriene validate *in vitro* asupra multiplelor tulpini bacteriene, inclusiv a celor întâlnite în mediul subgingival la pacienții cu parodontită, însă efectul lor nu a fost investigat în studii clinice. Lactoferina este o substanță antimicrobiană întâlnită în mod

natural în secrețiile din cavitatea orală (salivă, lichid crevicular), care se regăsește și în diverse preparate disponibile comercial.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Studiul 1. Influența unui concentrat plachetar (iPRF) asupra comportamentului celulelor stem mezenchimale gingivale

Introducere. Regenerarea parodontală este încă un rezultat terapeutic inconstant, indiferent de biomaterialele utilizate. Abordări experimentale actuale se bazează pe manipularea celulelor stem, însă translatarea în clinică întâmpină dificultăți. Concentratele plachetare sunt matrici autologe pe bază de fibrină cu bogat conținut celular, obținute în doar câteva minute din sânge centrifugat. Ele pot fi manipulate și modificate ușor și constituie un rezervor celular, un suport pentru migrarea celulelor locale și o sursă de molecule biologice active cu potențial de accelerare a vindecării.

Obiectivul principal al studiului a fost de a aprecia *in vitro* influența concentratului plachetar injectabil platelet-rich fibrin (iPRF) asupra celulelor stem mezenchimale gingivale (gMSC) izolate în prealabil, pentru posibila recomandare de utilizare a iPRF în practică, pentru stimularea capacității proliferative și de diferențiere a celulelor.

Material și metodă. Au fost utilizate gMSCs izolate de la pacienți care au suferit intervenții de chirurgie parodontală. Acestea care au fost ulterior cultivate în medii de cultură suplimentate cu iPRF în două procente diferite (5%iPRF, 10%iPRF), respectiv în mediul obținut prin înlocuirea cu iPRF a serului fetal bovin din mediul standard (10%iPRF-FCS). Concentratul plachetar a fost obținut prin centrifugarea sângelui recoltat de la un donator voluntar, la 700 rpm pentru 3 min. S-a realizat imunofenotiparea antigenilor de suprafață prin citometrie în flux, evaluarea proliferării celulelor cu metoda Cell Counting Kit-8 (CCK-8), evaluarea diferențierii osteogenice a celulelor prin cuantificarea expresiei genice prin RT-PCR și observarea prin microscopie optică a modificărilor morfologice suferite de celule.

Rezultate. Imunofenotiparea antigenilor de suprafață a relevat expresii relativ similare în cele trei grupuri experimentale, respectiv în grupul control, indicând un fenotip de celulă stem mezenchimală. Testul CCK-8 pentru analiza proliferării a evidențiat, în general, viabilitate celulară semnificativ mai redusă prin adăugarea de iPRF în mediile de cultură, în comparație cu mediul standard, cu excepția mediului 5%iPRF, după 7 zile de cultivare, care a evidențiat proliferare celulară semnificativ crescută față de celelalte medii. Analiza RT-PCR efectuată după 14 zile de cultură a pus în evidență expresia semnificativ mai mică a *RUNX2* în grupurile 10%iPRF și 10%iPRF-FCS, și o expresie semnificativ mai mică a *SPARC* în celulele cultivate în mediul 10%iPRF. Observarea prin

microscopie optică a gMSCs la 3, 7 și 14 zile a evidențiat, în general, morfologia fusiformă și organizarea în mici clustere a celulelor, indiferent de mediul de cultură.

Concluzii. Celulele cultivate în medii conținând iPRF și-au menținut caracterul de celule stem mezenchimale gingivale relevat de expresia antigenilor de suprafață, de expresia genelor de osteodiferențiere și de observațiile microscopice.

Studiul 2. Evaluări ale modificărilor suprafețelor radiculare produse de diferite tipuri de instrumentare mecanică subgingivală – un studiu in vitro

Introducere. Instrumentarea mecanică subgingivală reprezintă o abordare eficientă pentru reducerea cantității de placă bacteriană și tartru de pe suprafețele radiculare. Totuși, niciuna din tehnicile de instrumentare nu este capabilă să elimine în totalitate depozitele. Pe lângă evoluția clinică a parametrilor parodontali, este important de observat și suprafața radiculară rezultată în urma trecerii instrumentelor. Scopul final este o suprafață radiculară netedă, favorabilă vindecării țesuturilor dento-gingivale.

Obiectivul principal al studiului *in vitro* de față a fost observarea prin microscopie electronică de baleiaj (SEM) a efectului acțiunii mecanice (instrumente manuale și ultrasonice de detartraj) și chimice (un produs antiseptic pe bază de nanoparticule de argint) asupra suprafețelor radiculare ale unor dinți extrași.

Material și metodă. Au fost utilizați molari extrași, ale căror rădăcini au fost tratate prin 4 tratamente diferite: instrumentare manuală cu chiureta Gracey 7/8, instrumentare ultrasonică cu insertul 1S (Satelec Acteon), instrumentare ultrasonică cu insertul 1S plus insertul H4R/L, respectiv instrumentare ultrasonică cu insertul 1S plus insertul H4R/L și aplicarea suplimentară de *Perioflush*® (Dental Life Sciences). S-au preparat apoi probe de suprafețe radiculare de dimensiuni standard, câte 9 probe/tratament. Alterările de suprafață rezultate în urma tratamentelor au fost analizate descriptiv prin SEM.

Rezultate. Examinarea probelor prin SEM a pus în evidență, în general, prezența stratului de detritus la nivelul tuturor probelor. În cadrul grupurilor 2, 3 și 4 s-au observat șanțuri relativ superficiale trasate de instrumentele ultrasonice, cu depozitele de detritus abundent urmând striurile dispuse liniar, la nivelul suprafețelor tratate. Aplicarea produsului antiseptic nu pare să fi afectat stratul de detritus sau calitatea suprafeței radiculare.

Concluzii. Instrumentarea manuală cu chiureta Gracey a lăsat cea mai netedă suprafață. Detritusul a fost prezent pe suprafețele radiculare în cantitate semnificativă, indiferent de metoda de instrumentare. Aplicarea de *Perioflush*® nu a produs modificări observabile față de celelalte tratamente.

Studiul 3. Utilitatea unui preparat antiseptic pe bază de argint nanocoloidal ca adjuvant local în tratamentul nonchirurgical al parodontitelor: un studiu clinic randomizat de tip split-mouth

Introducere. Instrumentarea mecanică subgingivală împreună cu controlul plăcii bacteriene supragingivale sunt metode eficiente pentru îmbunătățirea parametrilor clinici parodontali, însă există situații clinice când acestea sunt insuficiente (forme severe de parodontită, cu factori de complexitate locali sau sistemici prezenți). Aplicarea adjuvantă de substanțe antiseptice locale are ca scop eliminarea bacteriilor reziduale din zonele dificil de accesat cu instrumentele mecanice, în vederea obținerii unei mai bune vindecări a țesuturilor parodontale afectate de boală.

Obiectivul principal al acestui studiu clinic a fost evaluarea posibilului efect suplimentar (în ameliorarea parametrilor clinici parodontali) al utilizării adjuvante a unei soluții antiseptice de irigare subgingivală pe bază de argint nanocoloidal disponibilă comercial (*Perioflush*®, Dental Life Sciences) în asociere cu terapia mecanică subgingivală, în tratamentul parodontitei.

Material și metodă. Un grup de 18 pacienți cu parodontită au fost tratați, conform unui design split-mouth, prin instrumentare mecanică subgingivală și irigații subgingivale cu *Perioflush*® (grupul experimental), respectiv instrumentare mecanică subgingivală și irigații subgingivale cu ser fiziologic (grupul control). S-a analizat evoluția parametrilor parodontali (indice de placă IHI, scor de sângerare la sondare BoP, adâncime la sondare PD și pierdere de atașament clinic CAL) pentru 72 situsuri (câte 1/cadran/pacient) prin compararea valorile inițiale cu cele de la reevaluarea la 3 luni post-operator. De asemenea au fost comparate valorile globale (experimental vs control, inițial vs reevaluare) ale IHI și BoP.

Rezultate. Pentru situsurile incluse în analiză, atât în grupul experimental cât și în grupul control s-a înregistrat o scădere statistic semnificativă a valorilor IHI, BoP și PD la reevaluare, față de valorile inițiale, dar fără diferențe statistic semnificative între grupuri. Global, atât IHI cât și BoP au înregistrat scăderi importante ale valorilor în cazul ambelor tipuri de tratamente.

Concluzii. Rezultatele studiului au relevat absența unui beneficiu clinic semnificativ în urma utilizării adjuvante de *Perioflush*® alături de instrumentarea mecanică subgingivală, în comparație cu instrumentarea mecanică subgingivală singură, subliniind rolul de standard de aur ocupat de terapia mecanică în tratamentul parodontitelor.

PhD THESIS ABSTRACT

Complex investigations of the effects of nonsurgical procedures in periodontitis

PhD student **Sofia Iozon (Ene)**

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



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION	13
STATE OF THE ART	
1. Nosological aspects associated with periodontitis. Periodontium	19
1.1. Current data and elements of comparison with the old classification	19
1.2. Updated notions of periodontal structure	22
1.2.1. General structural aspects	22
1.2.2. The epithelio-conjunctival adhesion interface of the gingiva	25
2. Advanced treatments in the management of periodontal diseases	27
2.1. Oral stem cells	27
2.1.1. Stem cells – general aspects	27
2.1.2. Stem cells sources in the oral cavity	28
2.1.3. Applications of stem cells in dentistry	30
2.2. Platelet concentrates used in periodontal therapy	32
2.2.1. The evolution of the types of platelet concentrates	32
2.2.2. Biological properties of platelet concentrates	34
2.2.3. Clinical applications of platelet concentrates in periodontology	36
3. Adjunctive antiseptic substances used in periodontitis therapy	37
3.1. Adjunctive treatments in non-surgical periodontal therapy	37
3.2. Antiseptic substances	38
3.2.1. Povidone iodine	38
3.2.2. Silver nanoparticles	38
3.3. Lactoferrin	39
PERSONAL CONTRIBUTIONS	
1. Research hypothesis and objectives	45
2. General methodology	47
3. Study 1 – The influence of a platelet concentrate (iPRF) on the behavior of gingival mesenchymal stem cells	49
3.1. Introduction	49
3.2. Working hypothesis	51

3.3. Materials and methods	52
3.4. Results	59
3.5. Discussion	67
3.6. Conclusions	72
4. Study 2 – Evaluation of root surface changes produced by different types of subgingival mechanical instrumentation methods – an <i>in vitro</i> study	73
4.1. Introduction	73
4.2. Working hypothesis	75
4.3. Materials and methods	75
4.4. Rezultate	79
4.5. Discussion	83
4.6. Conclusions	85
5. Study 3 – The efficacy of a nanocolloidal silver-based antiseptic preparation as a local adjuvant in the nonsurgical treatment of periodontitis: a split-mouth randomized clinical study	87
5.1. Introduction	87
5.2. Working hypothesis	89
5.3. Materials and methods	90
5.4. Rezultate	97
5.5. Discussion	104
5.6. Conclusions	108
6. General conclusions	109
7. Originality and innovative contributions of the thesis	113
REFERENCES	115

Key words: periodontitis, gingival mesenchymal stem cells, platelet concentrate, subgingival mechanical instrumentation, adjunctive antiseptic substances

INTRODUCTION

Periodontitis is an infectious-inflammatory disease of the supporting tissues of the teeth with high prevalence in the general population. In periodontitis, the therapeutic approach is centered on the removal of the primary etiological factor, namely the subgingival bacterial biofilm. Subgingival mechanical instrumentation is the gold standard in the treatment of periodontitis, but it is not capable to arrest the progression of the lesions and stabilize the disease in certain clinical situations. The adjunctive use of antimicrobial products has led to inconsistent clinical results. Various biomaterials have been designed to achieve periodontal healing after surgical or nonsurgical interventions, but also with inconsistent results.

The current doctoral thesis is structured in two parts. The *State of the art* includes three chapters that review the information from the literature regarding some aspects of periodontium's structure, classification systems of periodontal diseases, advanced treatments in periodontal therapy and some adjunctive antiseptic substances used in periodontology. The second part, *Personal contributions*, includes three studies, two *in vitro* and one clinical, investigating the influence of a platelet concentrate on gingival mesenchymal stem cells, root surface changes after mechanical and chemical treatments, and the clinical impact of an adjuvant local antiseptic product.

STATE OF THE ART

1. Nosological aspects associated with periodontitis. Periodontium

Over the years, the periodontal disease classification system has been modified according to the evolution of scientific evidence and its clinical applicability. The old systems differentiated the types of periodontitis according to the patient's age and its congruence with the degree of tissue destruction. The most recent classification system, however, includes conditions with interdental loss of attachment in the large class of "periodontitis", the variable clinical manifestations being due to different susceptibility and degrees of exposure in the population.

The periodontium is a highly specialized organ, consisting of four tissues: gingival mucosa, periodontal ligament, root cementum and alveolar bone. Due to the structural complexity, the healing of periodontal wounds involves the "recapitulation" of the phenomena in the course of morphogenesis, based on the favorable combination and sequence of regulatory biomolecules, progenitor cells, extracellular matrix support and blood supply. Restoring the form and function of periodontal tissues lost due to

periodontitis is a difficult goal to achieve, with all the evolution of the biomaterials and their manipulation methods.

2. Advanced treatments in the management of periodontal diseases

Depending on their origin, stem cells have different proliferative capacities and differentiation potential. The oral cavity is an abundant source of stem cells, which can be isolated from various structures: the pulp of temporary or permanent teeth, periodontal ligament, dental follicle, apical papilla or gingival tissue. The manipulation of stem cells led, through *in vitro* investigations, to different results in terms of tissue regeneration in the oral cavity.

Platelet concentrates are obtained from centrifuged blood by various protocols. They are widely used in surgical and nonsurgical techniques due to their biological properties: improving healing by accelerating the process and relieving symptoms, angiogenic and antibacterial role, supply of growth factors and immune cells, stimulation of local populations of progenitor cells.

3. Adjunctive antiseptic substances used in periodontitis therapy

In cases of moderate or severe periodontitis with deep periodontal pockets or other local or systemic complexity factors, subgingival mechanical instrumentation appears to be insufficient to treat and stabilize the disease. This supports the indication of the adjuvant use of various products with local or systemic administration to eliminate residual bacteria or to modulate the immune response of the host organism. Recent therapeutic guidelines do not recommend any topically applied antiseptic substance (either as subgingival irrigations or as a sustained-release product) that is effective in all clinical situations and provides additional clinical benefits over mechanical subgingival instrumentation.

Povidone iodine is a broad-spectrum antiseptic, effective *in vitro* against periodontal pathogens but without clear evidence of additional clinical benefit of its use in periodontal therapy. Silver nanoparticles possess antibacterial properties validated *in vitro* against multiple bacterial strains including those found in the subgingival environment of patients with periodontitis, but their effect has not been investigated in clinical trials. Lactoferrin is an antimicrobial substance found naturally in secretions from the oral cavity (saliva, crevicular fluid), which is also found in various commercially available products.

PERSONAL CONTRIBUTIONS

Study 1. The influence of a platelet concentrate (iPRF) on the behavior of gingival mesenchymal stem cells

Introduction. Periodontal regeneration is still an inconstant therapeutic result, regardless of the biomaterials used. Current experimental approaches rely on the manipulation of stem cells, but translation into the clinic faces difficulties. Platelet concentrates are autologous fibrin-based matrices with rich cellular content, obtained in just a few minutes from centrifuged blood. They can be easily manipulated and modified and represent a cellular reservoir, a support for local cell migration, and a source of biologically active molecules with the potential to accelerate healing.

The main **objective** of the study was to assess *in vitro* the influence of injectable platelet-rich fibrin (iPRF) on previously isolated gingival mesenchymal stem cells (gMSCs), for the possible recommendation of the use of iPRF in practice, to stimulate the proliferative and differentiation capacity of the cells.

Material and method. gMSCs isolated from patients who underwent periodontal surgery were used. These were subsequently cultivated in culture media supplemented with iPRF in two different concentrations (5%iPRF, 10%iPRF), respectively in the medium obtained by replacing fetal calf serum with iPRF in the standard medium (10%iPRF-FCS). The platelet concentrate was obtained by centrifuging the blood collected from a volunteer donor, at 700 rpm for 3 min. Several tests were performed: the immunophenotyping of surface antigens by flow cytometry, the evaluation of cell proliferation with the Cell Counting Kit-8 (CCK-8) method, the evaluation of the osteogenic differentiation of cells by quantifying gene expression by RT-PCR and the observation by optical microscopy of the morphological changes of the cells following culture in experimental media.

Results. Immunophenotyping of surface antigens revealed relatively similar expressions in the three experimental groups, respectively in the control group, indicating a mesenchymal stem cell phenotype. The CCK-8 assay for proliferation analysis generally revealed significantly lower cell viability with the addition of iPRF to the culture media compared to standard media, except for the 5%iPRF media after 7 days of culture, which revealed a significantly increased cell proliferation compared to the other environments. RT-PCR analysis performed after 14 days of culture revealed significantly lower expression of *RUNX2* in the 10%iPRF and 10%iPRF-FCS groups, and a significantly lower expression of *SPARC* in cells cultured in 10%iPRF medium. Optical microscopy observation of gMSCs at 3, 7, and 14 days generally revealed spindle-shaped morphology and organization in small clusters of cells, regardless of the culture medium.

Conclusions. Cells cultured in media containing iPRF maintained their gingival mesenchymal stem cell character as revealed by surface antigen expression, osteodifferentiation gene expression and microscopic observations.

Study 2. Evaluation of root surface changes produced by different types of subgingival mechanical instrumentation methods – an *in vitro* study

Introduction. Subgingival mechanical instrumentation is an effective method to reducing the amount of plaque and calculus on the root surfaces. However, none of the instrumentation techniques eliminates completely the deposits. In addition to the clinical evolution of the periodontal parameters, it is also important to observe the root surface morphology resulting from the passage of the mechanical instruments since one of the treatment goals is the obtaining of a smooth root surface favorable to the healing at the level of dento-gingival interface.

The main **objective** of this *in vitro* study was to observe by scanning electron microscopy (SEM) the effect of mechanical (manual and ultrasonic scaling tools) and chemical (an antiseptic product based on silver nanoparticles) actions on the root surfaces of some teeth extracted.

Material and method. Extracted molars were used. Their roots were treated by four different treatments: manual instrumentation with Gracey 7/8 curette, ultrasonic instrumentation with 1S tip (Satelec Acteon), ultrasonic instrumentation with 1S tip plus H4R/L tip, respectively ultrasonic instrumentation with 1S tip plus H4R/L tip and the additional application of *Perioflush*® (Dental Life Sciences). Root surface samples of standard size were then prepared, nine samples/treatment type. The surface alterations resulting from the treatments were descriptively analyzed by SEM.

Results. Examination of the samples by SEM highlighted, in general, the presence of the smear layer at the level of all samples. Within groups 2, 3 and 4, relatively shallow grooves traced by the ultrasonic instruments were observed with abundant detritus deposits following the linear pattern at the level of the treated surfaces. The application of the antiseptic product did not appear to have affected the smear layer or the quality of the root surface.

Conclusions. Manual instrumentation with Gracey curette left the smoothest surface. The smear layer was present on the root surfaces in significant quantity, regardless of the instrumentation method. The application of *Perioflush*® produced no observable changes compared to the other treatments.

Study 3. The efficacy of an nanocolloidal silver-based antiseptic preparation as a local adjuvant in the nonsurgical treatment of periodontitis: a split-mouth randomized clinical study

Introduction. Subgingival mechanical instrumentation together with supragingival plaque control are effective methods for improving periodontal clinical parameters, but these therapies seem to be insufficient in some clinical situations (severe forms of periodontitis, with local or systemic complexity factors). The adjuvant application of local antiseptic substances aims to eliminate residual bacteria from areas difficult to access with mechanical instruments in order to obtain a better healing of the periodontal tissues affected by the disease.

The main **objective** of this clinical study was to evaluate the possible additional effect in improving periodontal clinical parameters in periodontitis patients of a commercial adjunctive nanocolloidal silver-based antiseptic solution for subgingival irrigation (*Perioflush*®, Dental Life Sciences) in association with subgingival mechanical instrumentation over subgingival mechanical treatment alone.

Material and method. A group of 18 patients with periodontitis were treated according to a split-mouth design, by subgingival mechanical instrumentation plus subgingival irrigation with *Perioflush*® (experimental group) or with subgingival mechanical instrumentation plus subgingival saline irrigation (control group). The evolution of periodontal parameters (IHI plaque index, BoP bleeding on probing score, PD probing depth and CAL clinical attachment level) was analyzed for 72 sites (1/quadrant/patient) by comparing baseline values with those at 3 months re-evaluation after the initial treatment. Global values (experimental vs control, baseline vs re-evaluation) of IHI and BoP were also compared.

Results. For the sites included in the analysis, both in the experimental group and in the control group there was a statistically significant decrease in IHI, BoP and PD values at re-evaluation, compared to baseline values, but without statistically significant differences between groups. Overall, both IHI and BoP experienced significant decreases in values for both treatments.

Conclusions. The results of the study revealed the absence of a significant clinical benefit following the adjunctive use of *Perioflush*® associated with subgingival mechanical instrumentation compared to subgingival mechanical instrumentation alone highlighting thus the gold standard role of the mechanical therapy in the treatment of periodontitis.