

1 SCOPO DELLA TESI

Lo scopo della presente tesi è stato di valutare l'efficacia di tre trattamenti professionali (laser al diodo, acqua ozonizzata e clorexidina 0,20%) di diversa azione su una coltura di batteri cariogeni dell'essere umano, osservandone i potenziali effetti antimicrobici. Inoltre, grazie all'utilizzo di una tecnica di analisi *high throughput* sono state identificate le specie patogene e commensali sulle quali i trattamenti hanno maggiore effetto con lo scopo di individuare un possibile effetto mirato.

Lo studio sperimentale è stato effettuato nel periodo compreso tra gennaio 2022 e settembre 2022, presso il Centro per le Malattie Autoimmuni e Allergiche (CAAD) di Novara.

2 INTRODUZIONE

2.1 Il laser a diodi

2.1.1 Cenni storici all'utilizzo del laser

I primi principi teorici e fisici sulle radiazioni elettromagnetiche vennero formulati nel 1901 e nel 1913 con Plank, attraverso gli studi di meccanica quantistica, con Bohr, attraverso la descrizione della struttura atomica, fino ad arrivare ad Einstein nel 1916 che teorizzò la relatività generale. ^{[1][2][3]}

Il termine LASER è l'acronimo di "Light Amplification by the Stimulated Emission of Radiation" ed è stato introdotto per la prima volta nel 1959 da Gordon Gould. L'anno successivo il fisico Theodore Maiman costruì il primo laser funzionante, utilizzando una miscela di elio e neon. Nel 1961 venne prodotto il secondo laser al Neodimio, nel 1962 il primo laser a Diodo (arseniuro di gallio), nel 1963 il laser al rubino, infine nel 1964 fu sviluppato il laser CO₂. ^{[4][5][6]}

Le prime applicazioni del laser in ambito odontoiatrico si hanno nei primi anni '60 con l'utilizzo dei laser a rubino, che però producevano dannosi effetti termici. ^{[2][7]}

La diffusione in campo industriale è ormai esponenziale e oggi questa tecnologia è diventata parte integrante della nostra vita quotidiana. Nel 1987 la FDA (Food and Drug Administration) diede per la prima volta l'autorizzazione all'uso di una tecnologia laser in chirurgia orale. Alla fine degli anni '80 si ebbe una rivoluzione epocale, con lo sviluppo dei laser Er:YAG era possibile il suo in ambito odontoiatrico e dermatologico. Gli anni 2000 sono stati caratterizzati da un ampio sviluppo di laser più compatti, maneggevoli e versatili. ^{[1][6]}

Oggigiorno i laser a diodi sono ampiamente utilizzati nel campo dell'odontoiatrico. ^[4]

2.1.2 Caratteristiche principali del laser

Rispetto alla luce comune, la radiazione elettromagnetica laser viene generata non da un'emissione spontanea bensì da una stimolata. Da questo aspetto deriva l'origine dell'acronimo LASER. ^{[4][5]}

L'emissione spontanea di un fotone da parte di un atomo mediante il passaggio di un elettrone da uno stato energetico eccitato ad uno stabile stimola il rilascio di un fotone; di conseguenza, fasci di elettroni eccitati ad un determinato livello energetico possono essere indotti a rilasciare fotoni nello stesso istante dando origine ad un fascio di fotoni da cui origina il laser. Questa emissione stimolata genera una forma di luce molto coerente (onde sincrone), monocromatica (una singola lunghezza d'onda) e collimata (raggi paralleli). ^{[1][3]}

I laser in ambito medicale coprono praticamente tutto lo spettro delle radiazioni elettromagnetiche, mentre in odontoiatria quelli più utilizzati si trovano nel visibile e nel vicino e medio infrarosso. Tra i laser più comunemente utilizzati in odontoiatria figurano i laser a diodo. ^[4]

Questa tipologia fu introdotta a metà degli anni Novanta e il suo potenziale in diverse procedure chirurgiche è stato ben documentato. Il laser a diodi utilizza come mezzo attivo un semiconduttore solido di arseniuro di alluminio e gallio operante nella regione spettrale del vicino infrarosso, tra 808 e 980 nm. La lunghezza d'onda del laser a diodi è altamente assorbita dai tessuti pigmentati contenenti cromosfere di emoglobina, melanina e collagene e mostra uno scarso assorbimento da parte del tessuto dentale duro. Pertanto, questa lunghezza d'onda

consente un'azione selettiva ed è indicata per operazioni di taglio, vaporizzazione, coagulazione del sangue, curettage, emostasi e operazioni sui tessuti molli orali. Le potenze normalmente utilizzate in odontoiatria sono impostate da pochi mW (azione antalgica e biostimolazione) a 10 W. L'emissione di radiazioni può essere continua o pulsata e il sistema di trasmissione del raggio è fatto attraverso una fibra ottica flessibile che va da 200 a 600 nm. [2] [4] [6] [7]

2.1.3 Meccanismo d'azione del laser

La luce laser, come si è detto in precedenza, è una luce monocromatica ed è costituita da una singola lunghezza d'onda. È costituita da tre parti principali: una fonte di energia, un mezzo laser attivo e due o più specchi che formano una cavità ottica o un risonatore. Affinché l'amplificazione avvenga, l'energia viene fornita al sistema laser da un meccanismo di pompaggio, come un dispositivo stroboscopico con lampada flash, una corrente elettrica o una bobina elettrica. Questa energia viene pompata in un mezzo attivo contenuto all'interno di un risonatore ottico, producendo un'emissione spontanea di fotoni. [1] [5] Successivamente, avviene l'amplificazione mediante emissione stimolata poiché i fotoni vengono riflessi avanti e indietro attraverso il mezzo dalle superfici altamente riflettenti del risonatore ottico, prima della loro uscita dalla cavità tramite l'accoppiatore di uscita. Nei laser dentali, la luce laser viene fornita dal laser al tessuto target tramite un cavo in fibra ottica, una guida d'onda cava o un braccio articolato. Lenti di messa a fuoco, un sistema di raffreddamento e altri controlli completano il sistema. [1] [4]

2.1.4 Effetti dell'utilizzo del laser a diodi

L'integrazione del laser a diodi come supporto (e non sostitutivo) ha dimostrato largamente la sua efficacia grazie ad alcune caratteristiche e al modo con cui il raggio interagisce con i tessuti coinvolti. Fra i principali vantaggi del laser a diodi si ricordano:

- **Effetto battericida:** favorisce una riduzione della componente batterica della placca eliminando completamente, in associazione alla terapia meccanica, alcuni ceppi principali responsabili delle parodontiti (*Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides forsythus*, *Prevotella intermedia* e *Porphyromonas gingivalis*).^{[2] [3] [4] [6]}
- **Ricolonizzazione batterica più lenta nei siti trattati:** questo fenomeno sembra essere associato al coagulo che spesso viene a formarsi durante la decontaminazione con il laser, che fornirebbe un sigillo tra la cavità orale e la tasca parodontale.^{[1] [4]}
- **Rimozione facilitata dell'epitelio sulcolare e del tessuto di granulazione:** senza compromissione del connettivo sottostante con un abbattimento ulteriore della carica batterica e una riduzione significativa della profondità di sondaggio.^{[1] [7]}
- **Effetto biostimolante e antiedematoso:** ossia la capacità di indurre nei tessuti irradiati una replicazione cellulare più rapida senza che si verificano alterazioni di tipo morfologico e/o metabolico. Non è ancora del tutto chiaro il meccanismo di azione della biostimolazione, ma sembra che sia dovuto alla capacità del laser di indurre da una parte un aumento dell'attività mitocondriale.^{[1] [2]}

2.1.5 Vantaggi nell'utilizzo del laser a diodi

1. Riduzione dei tempi di lavoro: grazie a questa modalità, i trattamenti previsti dall'operatore si risolvono generalmente in minori sedute;
2. presenza del dolore è ridotta al minimo;
3. sostanziale riduzione, o totale assenza, di anestetici. Si tratta di una soluzione ideale per i pazienti più ansiosi o per i bambini;
4. assenza di gonfiore post-intervento;
5. tempi di guarigione più veloci. Il laser a diodi favorisce una cicatrizzazione più rapida rispetto agli interventi tradizionali;
6. riduzione di farmaci da assumere a conclusione dell'operazione;
7. assenza di rumore. Per questi motivi, può essere un'alternativa rassicurante da adottare in caso di trattamenti sui pazienti più giovani. ^{[1][6][7]}

2.1.6 Sicurezza all'utilizzo del laser

Sebbene la maggior parte dei laser dentali sia relativamente semplice da usare, è necessario adottare alcune precauzioni per garantirne un funzionamento sicuro ed efficace. Innanzitutto, sono gli occhiali protettivi da chiunque si trovi nelle vicinanze del laser, mentre è in uso. Ciò include l'operatore, l'assistente alla poltrona ed il paziente (anche qualsiasi accompagnatore nel caso fosse un minore o aventi disabilità). È fondamentale che tutti gli occhiali protettivi indossati siano specifici per la lunghezza d'onda. Inoltre, è fondamentale che ogni ambiente in cui sia utilizzato il dispositivo laser sia dotato di superfici adeguate a non riflettere i raggi emessi. ^{[1][6][7]}

2.1.7 Principali applicazioni del laser a diodi

Il laser odontoiatrico, grazie al suo meccanismo di funzionamento e all'estrema versatilità, può essere impiegato per una molteplicità di trattamenti sia funzionali che estetici.

Tra questi è possibile identificare:

- trattamento tasche parodontali,
- chirurgia parodontale,
- innesto di gengiva,
- chirurgia dei frenuli linguali e labiali,
- rimozione di neoformazioni (fibroma ed epulide),
- incisione e drenaggio degli ascessi,
- sterilizzazione e decontaminazione degli impianti,
- biostimolazione,
- sbiancamento dentale. ^{[1] [4]}

In quest'ultimo trattamento, il laser a diodi agisce da catalizzatore veicolando il prodotto sbiancante, velocizzando il processo chimico, dando un risultato maggiore e con effetti più duraturi nel tempo, rispetto allo sbiancamento tradizionale. Grazie all'attivazione del raggio laser il gel sbiancante (inizia rapidamente a dissolversi rilasciando radicali liberi che, agendo sui pigmenti scuri, riflettono la luce laser dando origine al processo di sbiancamento. I vantaggi principali dello sbiancamento laser rispetto al metodo tradizionale sono: minore invasività e rapidità, minori effetti collaterali (sensibilità post-trattamento), effetto sbiancante maggiore e durata maggiore nel tempo.

[1] [3] [6]

2.2 L'ozono

2.2.1 Cenni storici dell'ozono terapia

L'ozono terapia è stato adoperato a fini terapeutici a partire dal XIX secolo. La prima menzione dell'ozono fu fatta dal fisico olandese Martin van Marun nel 1785, notò che l'aria vicino alla sua macchina elettrostatica acquisiva un odore pungente quando passavano delle scintille elettriche. ^{[8] [9]}

Attualmente il chimico tedesco Christian Frederick Schonbein viene considerato il padre dell'ozono, che lo scoprì nel 1840 presso l'Università di Basilea in Svizzera. Secondo la lingua greca "ozein", lo chiamò ozono e tenne una conferenza intitolata "Sull'odore dell'elettrodo positivo durante l'elettrolisi dell'acqua" alla Società di scienze naturali di Basilea. ^{[8] [9] [10] [11]}

Il primo generatore di ozono fu sviluppato nel 1857 dall'imprenditore e ingegnere tedesco Werner Von Siemens e il dottore tedesco C. Lender nel 1870 utilizzò il macchinario per purificare il sangue. ^{[10] [12]}

Tuttavia, è stato solo nel 1932 che l'ozono è stato seriamente studiato dalla comunità scientifica, quando il dentista svizzero Edward Fisch utilizzò l'acqua ozonizzata come disinfettante. ^{[9] [12] [13]}

Il chirurgo Dr. Payr (1871-1946) osservò direttamente su sé stesso gli effetti benefici dell'applicazione locale di ozono su una pulpita gangrenosa, rimanendo stupito del risultato, volle estendere l'utilizzo dell'ozono nella chirurgia generale. ^[10]

Nel 1959 il fisico e medico tedesco Joachim Hänsler assieme al medico tedesco Hans Wolff svilupparono il primo generatore di ozono per uso medico chiamata "Ozonosan". Questo macchinario risulta essere la base per le attrezzature moderne. ^{[8] [11]}

2.2.2 Caratteristiche dell'ozono

L'ozono (O_3) è una molecola triatomica, costituita da tre atomi di ossigeno. Il suo peso molecolare è di 47, 98 g / mol, è un composto termodinamicamente altamente instabile che, a seconda delle condizioni quali temperatura e pressione, si decompone in ossigeno puro con una breve emivita (40 minuti a 20 °C). [13]

L'ozono è prodotto naturalmente dalla foto dissociazione dell'ossigeno molecolare in atomi di ossigeno attivati che poi reagiscono con ulteriori molecole di ossigeno. Questo anione radicale transitorio diventa rapidamente protonato, che a sua volta si decompone in un ossidante ancora potente, il radicale idrossile OH. [10] [13]

Sul pianeta Terra è presente abbondantemente (1–10 ppm) nella stratosfera, con funzione di assorbire i dannosi raggi ultravioletti, provenienti dal sole. Ha un alto potenziale di ossidazione che è 1,5 volte maggiore del cloruro quando usato come agente antimicrobico. [9] [11] [13] [14]

2.2.3 Meccanismi d'azione dell'ozono

Diverse sono le azioni note dell'ozono sul corpo umano, come immunostimolante, antiipossico, antimicrobico. Gli effetti principali sono:

- **Effetto immunostimolante:** l'ozono è in grado di influenzare il sistema immunitario cellulare e umorale. Stimola la proliferazione delle cellule immunocompetenti e la sintesi delle immunoglobuline. L'ozono ad alta concentrazione provoca un effetto immunodepressivo mentre nella sua bassa concentrazione ha un

effetto immunostimolante. ^{[10][12]}

- **Effetto antiipossico:** l'ozono provoca l'aumento di pO₂ nei tessuti e migliora il trasporto di ossigeno nel sangue, che si traduce in un cambiamento del metabolismo cellulare, attivazione dei processi aerobici (glicolisi, ciclo di Krebs, βossidazione degli acidi grassi) e utilizzo delle risorse energetiche. L'ozono migliora il metabolismo dei tessuti infiammati aumentandone l'ossigenazione e riducendo i processi infiammatori locali. ^{[10][12]}
- **Effetto antimicrobico:**
L'ozono agisce in modo distruttivo contro batteri, funghi e virus. L'effetto antimicrobico dell'ozono è il risultato della sua azione sulle cellule danneggiando la sua membrana citoplasmatica a causa dell'ozonolisi dei doppi legami e anche della modifica indotta dall'ozono dei contenuti intracellulari (ossidazione delle proteine perdita della funzione degli organelli) a causa degli effetti ossidanti secondari. ^{[10][11]} Questa azione è selettiva per le cellule microbiche; non danneggia le cellule del corpo umano. La sua attività antimicrobica aumenta in ambiente liquido dal pH acido. La letteratura mostra che l'applicazione di ozono in pochi secondi interrompe tutte le funzioni vitali dei batteri che sono incapaci di sviluppare alcuna autoimmunità alla sua azione. I batteri Gram positivi sono più sensibili all'azione dell'ozono rispetto ai batteri Gram negativi. ^{[8][10][11]}
- **Effetto biosintetico:** l'ozono attiva il metabolismo dei carboidrati, di proteine e dei lipidi. Questi cambiamenti a livello cellulare spiegano l'aumento dell'attività funzionale e il potenziale di rigenerazione di tessuti e organi. ^{[9][10]}

- **Effetto remineralizzante:** L'ozono agendo sulla sostanza organica dei tessuti dentali mineralizzati, ne intensifica il potenziale di remineralizzazione. Allo stesso tempo, è in grado di “aprire” i tubuli dentinali, il che consente la diffusione di ioni calcio e fosforo negli strati più profondi delle cavità cariose. ^{[10][11]}

2.2.4 Tossicità dell'ozono

L'inalazione di ozono può essere tossica per il sistema polmonare e altri organi. Gli effetti collaterali noti sono epifora, irritazione delle vie respiratorie superiori, rinite, tosse, mal di testa, nausea occasionale, vomito, mancanza di respiro, gonfiore dei vasi sanguigni, cattiva circolazione, problemi cardiaci e talvolta ictus. A causa dell'elevato potere ossidante dell'ozono, tutti i materiali che vengono a contatto con il gas devono essere resistenti all'ozono, come vetro, silicio e teflon. ^{[10][11][14]}

In caso di inalazione accidentale di ozono il paziente deve essere posto in posizione supina, facendogli inalare ossigeno umido. È consigliata l'assunzione di acido ascorbico, vitamina E, acetilcisteina. ^[10]

2.2.5 Controindicazioni dell'ozono terapia

Le principali controindicazioni sono: gravidanza, deficit di glucosio-6-fosfato deidrogenasi (favismo), ipertiroidismo, anemia severa, miastenia severa, emorragie, intossicazione acuta da alcol, recente infarto miocardico. ^{[8][10][14][15]}