
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Implicațiile stresului oxidativ în patogeneza parodontală și efectul protector al preparatelor antioxidante

Doctorand **Carina Culic**

Conducător de doctorat **Prof. Dr. Angela Pop**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

Introducere	11
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	13
1. Parodontitele	15
1.1. Etiopatogeneza bolii parodontale	15
1.1.1. Specificitatea bacteriană asociată diverselor forme de afectare parodontală	16
1.1.2. Factori de risc genetici	17
1.1.3 Factori de risc sistemici	18
1.2. Fiziopatologia și histologia parodontitelor	18
1.2.1. Evoluția leziunilor parodontale	18
1.3. Clasificarea afecțiunilor parodontale	22
2. Stresul oxidativ	24
2.1. Sinteza speciilor reactive ale oxigenului	24
2.2. Apărarea antioxidantă	25
2.2.1 Molecule endogene	26
2.2.2 Nutrienți	27
2.2.3 Compuși proveniți din dieta zilnică	28
2.3. Efectele excesului de SRO	28
2.4. Diagnosticul stresului oxidativ	29
3. Oxidul nitric	30
3.1. Sinteza oxidului nitric	30
3.2. Reactivitatea oxidului nitric	31
3.2.1. Oxidul nitric în stresul oxidativ	31
3.2.2. Oxidul nitric în stresul de nitrozare	32
3.2.3. Oxidul nitric în stresul nitrativ	33
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	36
4. Evaluarea stresului nitro-oxidativ în parodontite	38
4.1. Ipoteza de lucru	38
4.2. Metodologie generală	39
4.2.1. Reactivi	39
4.2.2. Evaluarea stresului oxidativ	39
Determinarea statusului oxidativ total seric	39
Determinarea capacității antioxidante totale	40
Calcularea indicelui de stres oxidativ	42
Determinarea malondialdehidei	42
Determinarea proteinelor carbonilate serice	42
Determinarea tiolilor serici totali	42
Determinarea glutationului seric	43
4.2.3. Evaluarea sintezei de oxid nitric	43

Evaluarea imunohistochimică a iNOS și 3-nitrotirozinei	43
Determinarea nitriților și nitraților serici totali	47
Determinarea 3-nitrotirozinei plasmatice	48
4.2.4. Determinarea metaloproteinazei-9 serice	48
4.2.5. Examinarea histopatologică	49
4.2.6. Analiza statistică	51
4.3. Evaluarea efectului cimetidinei asupra stresului nitro-oxidativ în parodontita experimentală la șobolan	52
4.3.1. Ipoteza de lucru	52
4.3.2. Material și metodă	53
Parodontita experimentală la șobolan	53
Protocolul experimental	54
4.3.3. Rezultate	56
4.3.4. Discuții	69
4.3.5. Concluzii	71
4.4. Efectul cimetidinei asupra stresului nitro-oxidativ și MMP-9 în parodontitele cronice marginale	72
4.4.1. Ipoteza de lucru	72
4.4.2. Material și metode	74
Selecția subiecților incluși în studiu și protocolul studiului	74
4.4.3. Rezultate	80
Indicii clinici parodontali	80
Evaluarea histopatologică a biopsiilor gingivale	82
Evaluarea stresului oxidativ	86
Evaluarea sintezei de oxid nitric	89
Determinarea metaloproteinazei-9 serice	98
4.4.4. Discuții	98
4.4.5. Concluzii	101
4.5. Concluzii generale	102
4.6. Originalitatea studiului	103
5. Referințe	104

CUVINTE CHEIE

parodontită, cimetidină, stres nitro-oxidativ, oxid nitric, MMP-9

INTRODUCERE

Medicina parodontală este o disciplină axată pe relația dintre parodontita cronică și bolile sistemice, o relație care este considerată a fi bidirecțională. Pornind de la această viziune sistemică a medicinei parodontale, este important să fie identificate noi metode de diagnostic patogenetic precoce, pentru a concepe un tratament patogenetic personalizat înainte de apariția determinărilor sistemice. Studiul de față a evaluat implicarea stresului nitro-oxidativ în patogeneza parodontitelor cronice și a testat tratamentul sistemic cu cimetidină, ca modalitate de modulare a reactivității gazdei.

MATERIAL SI METODE

Studiul s-a desfășurat în două etape. Prima etapă a testat efectul cimetidinei asupra stresului nitro-oxidativ din parodontita experimentală indusă la șobolan prin aplicarea unei ligaturi. După 14 zile, șobolanii au fost repartizați aleatoriu în următoarele loturi: lotul I – control negativ, șobolanii cărora li s-a desfăcut ligatura (CONTROL) + soluție salină (0.5ml ip) (n = 10); lotul II – parodontită indusă prin ligatură (PAR) + soluție salină (0.5ml ip) (n = 10); lotul III – PAR + aminoguanidină (AG) (50 mg/kg/d i.p.), un inhibitor selectiv al iNOS (n = 10); lotul IV – parodontita + NG-nitro-L-arginină metil-ester (NAME) (5 mg/kg/d i.p.), un inhibitor neselectiv al NOS (n = 10); lotul V – parodontită + L-arginină (ARG) (100 mg/kg/d i.p.), substratul sintezei oxidului nitric (n = 10); lotul VI – parodontită + TROLOX (20 mg/kg/d i.p), un antioxidant de sinteză (n = 10) ; lotul VII – parodontită + CIM(sursa) (100 mg/kg/day, p.o.).

În a doua etapă a fost testat efectul cimetidinei asupra stresului nitro-oxidativ la pacienți cu parodontită cronică marginală. Au fost selectați activ și direct un grup de 30 indivizi sănătoși ca lot martor negativ (15/15 Femei/Bărbați) și un grup de 75 subiecți cu parodontită cronică marginală (40/35 Femei/Bărbați). Pacienții au urmat tratament nechirurgical, care a constat din detartraj și tratament mecanic. Randomizat, 40 (20/20 Femei/Bărbați) dintre pacienții cu tratament nechirurgical au urmat și

tratament cu cimetidină (200mgx2/zi p.o.). Toți pacienții au fost evaluați înainte de tratament, după 30 de zile de tratamentul nechirurgical și respectiv cu cimetidină. De la fiecare pacient s-a recoltat biopsie gingivală și sânge prin puncție venoasă.

Stresul oxidativ a fost evaluat utilizând teste globale și teste specifice. Testele globale măsoară prin statusul oxidativ total (TOS) totalitatea compușilor oxidați, prin capacitatea antioxidantă totală (TAR) totalitatea antioxidantilor și prin indicele de stres oxidativ (ISO/OSI) raportul dintre oxidanți și antioxidanți. Testele specifice dozează compuși oxidați și antioxidanți specifici: dozarea peroxizilor lipidici prin determinarea malonildialdehidei (MDA), dozarea proteinelor carbonilate prin determinarea grupărilor carbonil (PC), dozarea tiolilor serici prin determinarea grupărilor sulfhidril (SH) totale, determinarea glutatationului seric (GSH).

Sinteza de oxid nitric (NO) a fost măsurată local și sistemic. Local a fost evaluată prin determinarea imunohistochimică a iNOS și 3-nitrotirozinei (3NT), iar sistemic a fost evaluată indirect prin măsurarea nitriților și nitraților serici totali (NOx) și măsurarea 3-NT plasmatică.

MMP-9 serică a fost măsurată ca indicator al leziunii tisulare induse de parodontită.

REZULTATE

Studiul 1. Evaluarea efectului cimetidinei asupra stresului nitro-oxidativ în parodontita experimentală la șobolan

La animalele PAR, creșterea nivelului de NOx din ser a fost mult mai mare decât la animalele din lotul de CONTROL (p 0.0005). Inhibitorii NOS, AG (p 0.01) și NAME (p 0.003) au redus nivelul de NOx. Antioxidantul TROLOX a redus, la rândul lui, nivelul de NOx (p 0.002). Nu s-au constatat diferențe semnificative între efectele inhibitorilor NOS și ale TROLOX (p>0.05). La animalele cărora li s-a administrat arginină, producția de NOx nu a fost mai mare decât la lotul PAR (p 0.2). CIM a avut un efect inhibitor semnificativ asupra sintezei NO în comparație cu PER (p = 0,001). CIM a redus NOx aproape de nivelul observat în grupul SHAM (p = 0,91). Efectul CIM asupra NOx a fost mai bun decât efectele AG, inhibitor al iNOS, (p = 0,008), NAME (p = 0,003), inhibitor nespecific al NOS, și Trolox antioxidant (p = 0,05).

Parodontita indusă prin ligatură a determinat o creștere semnificativă a statusului oxidativ total (TOS) (p 0.007) la toate animalele. Tratamentele cu AG (p 0.2), NAME (p 0.3) și ARG (p 0.4) nu au avut o influență mare asupra nivelului TOS. TROLOX-ul a fost singurul care a determinat o scădere semnificativă a TOS (p 0.004), scădere care a fost corelată cu reducerea nivelului NOx (r 0.70). Comparativ cu grupul PER, tratament

CIM a indus o mică scădere a TOS ($p = 0,026$), dar nu a redus TOS la nivelul observat la grupul SHAM ($p = 0,039$). Compararea tratament CIM la tratamente cu inhibitori de NOS a dezvăluit AG a avea un efect inhibitor mai mic ($p = 0,009$) și NAME a avea un efect comparabil ($p = 0,106$). Numai troloxul a indus o scădere mai semnificativă a TOS decât CIM ($p = 0,015$). Mai mult decât atât, reducerea TOS după tratament CIM a fost corelat cu reducerea NOx ($r = 0,70$).

Reactivitate antioxidantă totală (TAR), necesară pentru a evalua mecanismele antioxidante, a fost diminuată semnificativ de parodontita indusă prin ligatură ($p = 2.88E-05$), modificare corelată cu creșterea nivelului de NOx ($r = 0.75$). Tratamentul cu AG ($p = 5.73E-05$), NAME ($p = 8.73E-05$) și TROLOX ($p = 3.25E-06$) a dus la creșterea semnificativă a nivelului TAR. Efectele pe care le-au avut AG și NAME asupra TAR au fost comparabile ($p = 0.39$), iar TROLOX a avut efecte mai bune decât AG ($p = 0.01$) sau NAME ($p = 0.01$). Administrarea de arginină nu a influențat nivelul TAR la animalele PAR ($p = 0.2$). Mecanisme antioxidante au fost evaluate prin măsurarea TAR. Comparativ cu grupul de PER, TAR a fost crescut în mod semnificativ de tratament CIM ($p = 0,0029$). Inhibitorii NOS, AG ($p = 0,0001$) și NAME ($p = 0,0001$), au avut efecte inhibitorii mai bune decât CIM. Troloxul ($p = 1 \times 10^{-4}$) a avut efect antioxidant mai puternic decât CIM. Efectul asupra CIM TAR fost semnificativ corelată cu efectul asupra NOx ($r = -0.95$).

Provocarea parodontitei a determinat o creștere importantă a indicelui de stres oxidativ (ISO) ($p = 0.002$). Inhibitorii NOS AG ($p = 0.01$) și NAME ($p = 0.008$) au redus nivelul indicelui de stres oxidativ, efectele lor fiind comparabile ($p = 0.3$). Tratamentul antioxidant cu TROLOX a avut un puternic efect inhibitor ($p = 0.002$) și asupra ISO, fiind mai eficient în acest sens decât AG ($p = 0.01$) și NAME ($p = 0.03$). Administrarea de ARG ca substrat al sintezei oxidului nitric nu a avut nici o influență asupra ISO ($p = 0.23$). ISO a fost corelat cu TOS la loturile PAR ($r = 0.99$), AG ($r = 0.90$), NAME ($r = 0.84$) și TROLOX ($r = 0.96$). CIM a redus ISO în grupul PER ($p = 0,002$), dar nu a atins nivelul grupului SHAM ($p = 0,004$). Efectul CIM a fost comparabil cu cel al AG ($p = 0,99$) și NAME ($p = 0,367$). Asupra ISO Troloxul a avut un efect inhibitor semnificativ mai bun decât CIM ($p = 0,002$). În grupul CIM, ISO a fost corelat cu NOx ($r = 0,71$) și TOS ($r = 0,83$).

Studiul 2. Efectul cimetidinei asupra stresului nitro-oxidativ și MMP-9 în parodontitele cronice marginale

La toți pacienții cu parodontită cronică marginală indicii clinici parodontali evaluați au fost semnificativ crescuți față de martorul sănătos ($p < 0.001$). Tratamentul nechirurgical și cel cu cimetidină au ameliorat PD și CAL ($p < 0.01$). BOP a fost redus puțin de SRP ($p < 0.01$) și foarte semnificativ de cimetidină ($p < 0.001$).

Examinarea biopsiilor gingivale prin colorație HE s-a observat că la pacienții cu parodontită marginală cronică infiltratul leucocitar este bogat și predominant cu neutrofile. Evaluarea semicantitativă confirmă prezența infiltratului leucocitar

semnificativ ($p < 0,001$) predominant neutrofilic ($p < 0,001$) și cu mai puține monocite ($p < 0,01$).

TOS a scăzut ușor după tratamentul nechirurgical ($p < 0,05$). Tratamentul adjuvant cu cimetidină nu a avut efect important ($p > 0,05$). TAR a crescut semnificativ după tratamentul nechirurgical ($p < 0,05$). La grupul cu tratament medicamentos TAR a crescut ($p < 0,05$). Având în vedere creșterea TAR după tratamentul nechirurgical, s-a constatat că OSI s-a redus foarte semnificativ ($p < 0,001$). După tratamentul adjuvant OSI a scăzut prin creșterea TAR. MDA nu prezintă modificări importante după tratamentul nechirurgical SRP ($p > 0,05$). Asocierea cimetidinei a scăzut ușor semnificativ MDA ($p < 0,05$). PC și SH s-au redus și ele ușor semnificativ după tratament medicamentos ($p < 0,05$). GSH a crescut nesemnificativ după tratamentul nechirurgical ($p > 0,05$), iar cimetidina l-a crescut semnificativ ($p < 0,001$).

La pacienții cu parodontite cronice marginale s-au înregistrat creșteri importante ale celulelor inflamatorii ($p < 0,001$) față de control. Aplicarea terapiei nechirurgicale ameliorează inflamația cronică și expresia iNOS și 3NT în țesuturile parodontale ale pacienților cu parodontită cronică ($p < 0,01$). Față de control expresia iNOS și 3NT crește semnificativ în parodontitele cronice marginale ($p < 0,001$). Există deosebiri în funcție de stadiul parodontitelor. Astfel, în stadiul acut exprimarea iNOS și 3NT este semnificativ mai redusă decât în stadiul cronic ($p < 0,001$). Trecerea la stadiul cu fibroză face ca exprimarea iNOS și 3NT să se reducă ($p < 0,001$), ajungând aproximativ la nivelul din stadiul acut ($p > 0,05$). S-a observat că expresia iNOS și 3NT în celulele epiteliale din zone de epitelium gingival cu exocitoză leucocitară este mult mai mare decât în zone de epitelium fără exocitoză leucocitară ($p < 0,001$). De asemenea s-a observat că leucocitele aflate în epitelium exprimau o cantitate dublă de iNOS față de celulele epiteliale ($p < 0,001$). În celulele din țesutul conjunctiv subepitelial, expresia iNOS și 3NT a fost dublă față de celulele epiteliale de acoperire ($p < 0,001$). În profunzime am cuantificat expresia iNOS din zone în care macrofagele ocupau aproape jumătate din suprafața câmpului microscopic. Au fost observate diferențele de expresie a iNOS și 3NT în celulele din zonele profunde ale gingiei cu inflamație cronică și fibroză. Macrofagele exprimau cea mai mare cantitate de iNOS diferențele fiind semnificative statistic față de alte celule: fibrocite ($p < 0,005$), plasmocite ($p = 0,001$) și celule endoteliale ($p < 0,001$). Plasmocitele au fost mai slab încărcate cu iNOS față de fibrocite dar diferențele nu au fost semnificative statistic ($p = 0,61$). Celulele endoteliale au fost cel mai slab pozitive la iNOS și 3NT, mai slab chiar decât plasmocitele ($p < 0,005$). Celulele inflamatorii subepiteliale au exprimat mult mai mult iNOS și 3NT decât celulele epiteliale ($p < 0,001$). În lipsa inflamației, celulele endoteliale secretă cantități mai mari de iNOS și 3NT decât fibrocitele ($p < 0,01$), dar în cazul fibrozei cicatriciale din parodontite, fibrocitele vor secreta cantități mai mari decât endotelium ($p < 0,05$). Ambele categorii de celule secretă cantități mult mai mari de enzimă în contextual fibrozei cicatriciale decât în condiții normale ($p < 0,001$).

La nivel sistemic concentrația nitriților și nitraților a fost semnificativ crescută la pacienții cu parodontită cronică față de martorul negativ ($p < 0,001$). Tratamentul nechirurgical nu a produs o scădere importantă ($p > 0,05$). Tratamentul adjuvant cu cimetidină a avut efecte inhibitorii importante asupra nivelului sistemic al nitriților și nitraților ($p < 0,01$). Nivelul nitriților și nitraților s-a corelat cu cel al 3NT serice la toate grupurile de pacienți.

Nivelul MMP-9 a fost ridicat la pacienții parodontali fără tratament ($p < 0,001$). Tratamentele mecanic și cel medicamentos cu cimetidină au determinat o reducere semnificativă a MMP-9 ($p < 0,001$).

Concluzii generale

- 1. Parodontitele se asociază cu un nivel crescut de stres nitro-oxidativ. Aceasta se datorează creșterii infiltratului leucocitar cu fagocite neutrofile și mononucleare, în care este stimulată expresia iNOS. Sinteza excesivă de oxid nitric duce la formarea unor cantități crescute de 3-nitrotozină.**
- 2. Severitatea leziunilor parodontale se corelează cu stresul nitro-oxidativ parodontal. Această concluzie este susținută de modificările indicilor parodontali utilizați pentru cuantificarea leziunilor parodontale.**
- 3. Tratamentul parodontal nechirurgical reduce inflamația locală și nivelul stresului nitro-oxidativ. Inflamația parodontală a fost evaluată prin indicii parodontali și examenul histopatologic al biopsiilor parodontale.**
- 4. Tratamentul cu cimetidină are efecte inhibitorii asupra inflamației parodontale și asupra stresului nitro-oxidativ parodontal. Aceste efecte sunt mai bune decât cele ale tratamentului parodontal nechirurgical.**
- 5. Parodontitele se asociază cu o creștere importantă a stresului nitro-oxidativ sistemic datorită sintezei excesive de specii reactive de oxigen, specii reactive de azot și deficit de antioxidanți.**
- 6. În parodontite, tratamentul parodontal nechirurgical scade nivelul sintezei de specii reactive de oxigen, specii reactive de azot și crește cantitatea de antioxidanți.**
- 7. Tratamentul sistemic cu cimetidină are efect superior celui nechirurgical local în ceea ce privește reducerea stresului nitro-oxidativ sistemic, deoarece scad speciile reactive de oxigen și speciile reactive de azot și crește cantitatea de antioxidanți.**
- 8. În parodontite crește nivelul sistemic de MMP-9.**
- 9. Tratamentul parodontal nechirurgical reduce concentrația sistemică de MMP-9.**

10. Tratamentul sistemic cu cimetidină inhibă mai mult sinteza de MMP-9 decât tratamentul nechirurgical.
11. În ansamblu, aceste rezultate evidențiază faptul că la pacienții cu parodontită cronică marginală reducerea stresului nitro-oxidativ și a MMP-9 poate reprezenta o alternativă terapeutică antiinflamatoare viabilă, realizabilă prin tratament parodontal nechirurgical asociat cu tratament sistemic cu cimetidină.

Originalitatea studiului

În parodontologie majoritatea studiilor existente au analizat modificările locale de la nivelul parodontiului. Astfel, la nivel parodontal a fost confirmată prezența stresului nitro-oxidativ ca mecanism patogenetic asociat leziunilor locale și răspunsului inflamator sistemic.

Originalitatea studiului de față este conferită în primul rând de efectul inhibitor al terapiei sistemice cu cimetidină asupra stresului nitro-oxidativ și a sintezei de MMP-9, simultan local și sistemic, în parodontite.

În al doilea rând, studiul este original pentru că a relevat că efectul cimetidinei administrate sistemic este superior tratamentului parodontal nechirurgical, ceea ce recomandă asocierea celor două mijloace terapeutice.

Toate aceste constatări sunt importante din mai multe puncte de vedere:

- pozitivarea testelor sistemice de stres nitro-oxidativ și a MMP-9 permite realizarea unui diagnostic precoce de severitate în parodontite și monitorizarea evoluției bolii.
- stresul nitro-oxidativ și MMP-9 pot fi indicatori prognostici, deoarece pot determina leziuni sistemice secundare, asociate celor parodontale primare.

ABSTRACT OF THE PHD THESIS

The implications of oxidative stress in the periodontal pathogenesis and the protective effect of antioxidant treatment

PhD Student **Carina Culic**

PhD Coordinator **Prof. Dr. Angela Pop**

TABLE OF CONTENTS

Introduction	11
THE PRESENT DAY STAGE OF KNOWLEDGE	13
1. Periodontitis	15
1.1. Etiopathogenesis of periodontitis	15
1.1.1. The plaque	16
1.1.2. Systemic risk factors	17
1.1.3. Genetic risk factors	18
1.2. The physiopathology and histology of periodontitis	18
1.2.1. Evolution of periodontal lesions	18
1.3. The classification of periodontal disease	22
2. Oxidative stress	24
2.1. The synthesis of the reactive species of oxygen	24
2.2. Antioxidant defense	25
2.2.1 Endogen molecules	26
2.2.2 Nutrients	27
2.2.3 Compounds from daily diet	28
2.3. The effects of the excess of ROS	28
2.4. The diagnosis of oxidative stress	29
3. Nitric oxide	30
3.1. The synthesis of nitric oxide	30
3.2. The reactivity of nitric oxide	31
3.2.1. Nitric oxide in oxidative stress	31
3.2.2. Nitric oxide in nitrosation stress	32
3.2.3. Nitric oxide in nitrative stress	33
PERSONAL CONTRIBUTION	36
4. The assessment of nitro-oxidative stress in cases of periodontitis	38
4.1. The work hypothesis	38
4.2. General methodology	39
4.2.1. Reagents	39
4.2.2. The assessment of oxidative stress	39
Determination of the total serum oxidative status	39
Determination of the total antioxidant capacity	40
Calculation of the oxidative stress index	42
Determination of malondialdehyde	42

Determination of serum protein carbonyl groups	42
Determination of total serum thiols	42
Determination of serum glutathione	43
4.2.3. The assessment of nitric oxide synthesis	43
Immunohistochemical assessment of iNOS and 3-nitrotyrosine	43
Determination of total serum nitrites and nitrates	47
Determination of plasmatic 3-nitrotyrosine	48
4.2.4. Determination of serum metalloproteinase-9	48
4.2.5. Histopathological examination	49
4.2.6. Statistical analysis	51
4.3. Assessment of the effect of cimetidine on nitro-oxidative stress in the experimental periodontitis of the rat	52
4.3.1. Work hypothesis	52
4.3.2. Material and method	53
Experimental periodontitis of the rat	53
Experimental protocol	54
4.3.3. Results	56
4.3.4. Discussions	69
4.3.5. Conclusions	71
4.4. The effect of cimetidine on nitro-oxidative stress and MMP-9 in chronic marginal periodontitis	72
4.4.1. Work hypothesis	72
4.4.2. Material and method	74
Selection of the subjects included in the study and the study protocol	74
4.4.3. Results	80
Periodontal clinical indices	80
The histopathological assessment of gingival biopsies	82
The assessment of oxidative stress	86
The assessment of nitric oxide synthesis	89
Determination of serum metalloproteinase-9	98
4.4.4. Discussions	98
4.4.5. Conclusions	101
4.5. General conclusions	102
4.6. The originality of the study	103
5. References	104

KEYWORDS

parodontitis, cimetidine, nitro-oxidative stress, nitric oxide, MMP-9

INTRODUCTION

Periodontal medicine is a discipline focused on the relationship between chronic periodontitis and systemic diseases, a relationship which is considered bidirectional. Starting from this systemic vision of periodontal medicine, it is important to identify new methods of precocious pathogenetic diagnosis, in order to conceive a personalized pathogenetic treatment before the emergence of systemic determinations. This study has assessed the involvement of nitro-oxidative stress in the pathogenesis of chronic periodontitis and tested the systemic treatment with cimetidine, as a way to modulate the host's reactivity.

MATERIAL AND METHODS

The study was carried out in two stages. The first stage tested the effect of cimetidine on nitro-oxidative stress in the experimental periodontitis of the rat by the application of a ligature. After 14 days, the rats were randomly separated in the following groups: group I – control negative, the rats whose ligature was undone (CONTROL) + saline solution (0.5ml ip) (n = 10); group II – periodontitis induced through the ligature (PAR) + saline solution (0.5ml ip) (n = 10); group III – PAR + aminoguanidine (AG) (50 mg/kg/d i.p.), a selective inhibitor of iNOS (n = 10); group IV – periodontitis + NG-nitro-L-arginine methyl-ester (NAME) (5 mg/kg/d i.p.), a non-selective inhibitor of NOS (n = 10); group V – periodontitis + L-arginine (ARG) (100 mg/kg/d i.p.), the substrate of nitric oxide synthesis (n = 10); group VI – periodontitis + TROLOX (20 mg/kg/d i.p.), a synthesis antioxidant (n = 10) ; group VII – periodontitis + CIM(source) (100 mg/kg/day, p.o.).

In the second stage the effect of cimetidine was tested on nitro-oxidative stress in patients with chronic marginal periodontitis. A group of 30 healthy individuals was selected actively and directly as negative control group (15/15 Women/Men) and a group of 75 subjects with chronic marginal periodontitis (40/35 Women/Men). The patients took a non-surgical treatment, consisting of descaling and mechanical treatment.

Randomly, 40 (20/20 Women/Men) of the patients with non-surgical treatment also received a treatment with cimetidine (200mgx2/day p.o.). All patients were assessed before treatment, after 30 days of non-surgical treatment and respectively treatment with cimetidine. Gingival biopsy and blood through venous puncture were taken from each patient.

The oxidative stress was assessed using global tests and specific tests. The global tests measure through the total oxidative status (TOS) the totality of oxidized compounds, through the total antioxidant capacity (TAR) the totality of antioxidants and through the oxidative stress index (ISO/OSI) the ratio between oxidants and antioxidants. The specific tests dose specific oxidant and antioxidant compounds: the dosing of lipid peroxides by the determination of the monoaldehyde (MDA), the dosing of protein carbonyls by the determination of the carbonyl groups (PC), the dosing of the serum thiols by the determination of the sulfhydryl groups (PC), the determination of serum glutathione (GSH).

The synthesis of nitric oxide (NO) was measured locally and systemically. Locally it was assessed by the immunohistochemical determination of iNOS and 3- nitrotyrosine (3NT), and systemically it was assessed by the measuring of the total serum nitrites and nitrates (NO_x) and the measuring of plasma 3-NT.

Serum MMP-9 was measured as an indicator of tissue damage induced by periodontitis.

RESULTS

Study 1. Assessment of the effect of cimetidine on nitro-oxidative stress in the experimental periodontitis of the rat

In the PAR animals, the increase of the level of NO_x in the serum was higher than in the CONTROL group (p 0.0005). NOS inhibitors, AG (p 0.01) and NAME (p 0.003) reduced the level of NO_x. The antioxidant TROLOX reduced, in its turn, the level of NO_x (p 0.002). No significant differences were found between the effects of the NOS inhibitors and those of TROLOX (p>0.05). In the animals who were given arginine, the production of NO_x was not higher than in the PAR group (p 0.2). CIM had a significant inhibitive effect on the synthesis of NO as compared to PER (p = 0,001). CIM reduced NO_x close to the level observed in the SHAM group (p = 0,91). The effect of CIM on NO_x was better than the effects of AG, inhibitor of iNOS, (p = 0,008), NAME (p = 0,003), non-specific inhibitor of NOS, and Trolox antioxidant (p = 0,05).

Periodontitis induced through the ligature determined a significant increase of the total oxidative status (TOS) (p 0.007) in all the animals. The treatments with AG (p 0.2), NAME (p 0.3) and ARG (p 0.4) did not have a large influence on the TOS level.

TROLOX was the only one that determined a significant decrease of TOS ($p = 0.004$), decrease which was correlated with the reduction of the level of NOx ($r = 0.70$). As compared to the PER group, the CIM treatment induced a small decrease of TOS ($p = 0.026$), but did not reduce TOS to the level observed in the SHAM group ($p = 0.039$). The comparison of the CIM treatment with treatments with NOS inhibitors NOS revealed that AG has a lower inhibiting effect ($p = 0.009$) and NAME has a comparable effect ($p = 0.106$). Only trolox induced a more significant decrease of TOS than CIM ($p = 0.015$). Moreover, the reduction of TOS after CIM treatment was correlated with the reduction of NOx ($r = 0.70$).

Total antioxidant reactivity (TAR), necessary to assess the antioxidant mechanisms was significantly reduced by periodontitis induced through ligature ($p = 2.88E-05$), modification correlated with the increase of the level of NOx ($r = 0.75$). Treatment with AG ($p = 5.73E-05$), NAME ($p = 8.73E-05$) and TROLOX ($p = 3.25E-06$) led to the significant increase of the level of TAR. The effects AG and NAME had on TAR were comparable ($p = 0.39$), and TROLOX had better effects than AG ($p = 0.01$) or NAME ($p = 0.01$). The administration of arginine did not influence the level of TAR in PAR animals ($p = 0.2$). Antioxidant mechanisms were assessed by the measuring of TAR. As compared to the PER group, TAR was significantly increased by CIM treatment ($p = 0.0029$). NOS inhibitors, AG ($p = 0.0001$) and NAME ($p = 0.0001$), had better inhibitive effects than CIM. Trolox ($p = 1 \times 10^{-4}$) had a stronger antioxidant effect than CIM. The effect on CIM TAR was significantly correlated with the effect on NOx ($r = -0.95$).

The induction of periodontitis determined an important increase of the oxidative stress index (ISO) ($p = 0.002$). NOS inhibitors AG ($p = 0.01$) and NAME ($p = 0.008$) reduced the level of the oxidative stress index, their effects being comparable ($p = 0.3$). The antioxidant treatment with TROLOX had a strong inhibitive effect ($p = 0.002$) also on ISO, being more efficient in this sense than AG ($p = 0.01$) and NAME ($p = 0.03$). The administration of ARG as substrate of the synthesis of nitric oxide had no influence on ISO ($p = 0.23$). ISO was correlated with TOS in the PAR ($r = 0.99$), AG ($r = 0.90$), NAME ($r = 0.84$) and TROLOX ($r = 0.96$) groups. CIM reduced ISO in the PER group ($p = 0.002$), but did not reach the level of the SHAM group ($p = 0.004$). The effect of CIM was comparable with that of AG ($p = 0.99$) and NAME ($p = 0.367$). On ISO Trolox had a significantly better inhibitive effect than CIM ($p = 0.002$). In the CIM group, ISO was correlated with NOx ($r = 0.71$) and TOS ($r = 0.83$).

Study 2. The effect of cimetidine on nitro-oxidative stress and MMP-9 in chronic marginal periodontitis

In all patients with chronic marginal periodontitis the periodontal clinical indices assessed were significantly increased as compared to the healthy control ($p < 0.001$). Non-surgical treatment and that with cimetidine improved PD and CAL ($p < 0.01$). BOP was slightly reduced by SRP ($p < 0.01$) and very significantly by cimetidine ($p < 0.001$).

Upon examination of gingival biopsies with HE coloration it was observed that in patients with chronic marginal periodontitis the leukocytic infiltrate is rich and predominantly with neutrophils. The semiquantitative assessment confirms the presence of significant leukocytic infiltrate ($p < 0,001$) predominantly neutrophilic ($p < 0,001$) and with less monocytes. ($p < 0,01$).

TOS decreased slightly after the non-surgical treatment ($p < 0,05$). The adjuvant treatment with cimetidine had no important effect ($p > 0,05$). TAR significantly increased after the non-surgical treatment ($p < 0,05$). In the group with drug treatment TAR increased ($p < 0,05$). Having in view the increase of TAR after the non-surgical treatment, it was found that OSI was significantly reduced ($p < 0,001$). After the adjuvant treatment OSI decreased by the increase of TAR. MDA does not show important modifications after the non-surgical treatment SRP ($p > 0,05$). The association of cimetidine decreased MDA slightly significantly ($p < 0,05$). PC and SH were also reduced slightly significantly after drug treatment ($p < 0,05$). GSH increased non-significantly after the non-surgical treatment ($p > 0,05$), and cimetidine increased it significantly ($p < 0,001$).

In patients with chronic marginal periodontitis important increases of the inflammatory cells were recorded ($p < 0,001$) as compared to the control. The application of non-surgical treatment improves chronic inflammation and the expression of iNOS and 3NT in the periodontal tissues of patients with chronic periodontitis ($p < 0,01$). As compared to the control the expression of iNOS and 3NT significantly increases in chronic marginal periodontitis ($p < 0,001$). There are differences according to the stage of the periodontal diseases. Thus, in the acute stage the expression of iNOS and 3NT is significantly reduced than it is in the chronic stage ($p < 0,001$). The passing to the stage with fibrosis leads to the reduction of the expression of iNOS and 3NT ($p < 0,001$), reaching approximately the level from the acute stage ($p > 0,05$). It was noticed that the expression of iNOS and 3NT in the epithelial cells from areas of the gingival epithelium with leukocytic exocytosis is much higher than in the areas of epithelium without leukocytic exocytosis ($p < 0,001$). It was also observed that the leukocytes situated in the epithelium expressed a double amount of iNOS as compared to the epithelial cells ($p < 0,001$). In the cells of the subepithelial conjunctive tissue, the expression of iNOS and 3NT was double than the cells of the covering epithelium ($p < 0,001$). In depth we quantified the expression of iNOS from areas where the macrophages occupied almost half of the surface of the microscopic field. The differences between the expressions of iNOS and 3NT in the deep areas of the gum with chronic inflammation and fibrosis were observed. The macrophages expressed the largest amount of iNOS the differences being statistically significant as compared to other cells: fibrocytes ($p < 0,005$), plasma cells ($p = 0,001$) and endothelial cells ($p < 0,001$). Plasma cells were less loaded with iNOS than the fibrocytes but the differences were not statistically significant. ($p = 0,61$). Endothelial cells were the least positive to iNOS and 3NT, even less than the plasma cells ($p < 0,005$). Subepithelial inflammatory cells expressed much more iNOS and 3NT than epithelial cells ($p < 0,001$). In the absence of inflammation, endothelial cells secrete larger amounts of

iNOS and 3NT than fibrocytes ($p < 0,01$), but in the case of scar tissue fibrosis in periodontal diseases, fibrocytes will secrete larger amounts than the endothelium ($p < 0,05$). Both cell categories secrete much larger amounts of enzyme in the context of scar tissue fibrosis than in normal conditions ($p < 0,001$).

At the systemic level the concentration of nitrites and nitrates was significantly increased in patients with chronic periodontitis as compared to the negative control ($p < 0,001$). The non-surgical treatment did not lead to an important decrease ($p > 0,05$). The adjuvant treatment with cimetidine had important inhibitive effects on the systemic level of nitrites and nitrates ($p < 0,01$). The level of nitrites and nitrates was correlated with that of serum 3NT in all groups of patients.

The level of MMP-9 was high in periodontal patients without treatment ($p < 0,001$). Mechanical treatments and the drug treatment with cimetidine led to a significant reduction of MMP-9 ($p < 0,001$).

General conclusions

- 12. Periodontitis is associated with a high level of nitro-oxidative stress. This is due to the increase of the leukocytic infiltrate with neutrophilic and mononuclear phagocytes, where the expression of iNOS is stimulated. The excessive synthesis of nitric oxide leads to the formation of increased amounts of 3-nitrotyrosine.**
- 13. The severity of periodontal lesions is correlated with periodontal nitro-oxidative stress. This conclusion is supported by the modifications of the periodontal indices used for the quantification of periodontal lesions.**
- 14. Non-surgical periodontal treatment reduces local inflammation and the level of nitro-oxidative stress. Periodontal inflammation was assessed by the periodontal indices and the histopathological examination of periodontal biopsies.**
- 15. The treatment with cimetidine has inhibitive effects on periodontal inflammation and on periodontal nitro-oxidative stress. These effects are better than those of the non-surgical periodontal treatment.**
- 16. Periodontitis is associated with an important increase of systemic nitro-oxidative stress due to the excessive synthesis of reactive species of oxygen, reactive species of nitrogen and deficit of antioxidants.**
- 17. In periodontitis, the non-surgical periodontal treatment decreases the synthesis level of reactive species of oxygen, reactive species of nitrogen and increases the amount of antioxidants.**

18. The systemic treatment with cimetidine has a superior effect as compared to the non-surgical local one concerning the reduction of systemic nitro-oxidative stress, because it decreases the reactive species of oxygen and the reactive species of nitrogen and increases the amount of antioxidants.
19. In cases of periodontitis the systemic level of MMP-9 increases.
20. The non-surgical periodontal treatment reduces the systemic concentration of MMP-9.
21. The systemic treatment with cimetidine inhibits the synthesis of MMP-9 more than the non-surgical treatment.
22. Altogether, these results highlight the fact that in patients with chronic marginal periodontitis the reduction of nitro-oxidative stress and of MMP-9 may represent a viable anti-inflammatory therapeutic alternative, which can be realized by non-surgical periodontal treatment associated with systemic treatment with cimetidine.

The originality of the study

In periodontology most existing studies have analyzed the local modifications from the level of the periodontium. Thus, at the periodontal level, the presence of nitro-oxidative stress was confirmed, as pathogenetic mechanism associated to local lesions and to the systemic inflammatory response.

The originality of this present study is conferred in the first place by the inhibitive effect of the systemic therapy with cimetidine on nitro-oxidative stress and on the synthesis of MMP-9, simultaneously locally and systemically, in cases of periodontitis.

In the second place, the study is original because it revealed that the effect of cimetidine given systemically is superior to the non-surgical periodontal treatment, which recommends the association of the two therapeutic agents.

All these findings are important from several points of view:

- the positivation of the nitro-oxidative stress and MMP-9 systemic tests allows for a precocious diagnosis of severity in cases of parodontitis and the monitoring of the evolution of the disease.
- nitro-oxidative stress and MMP-9 may be prognostic indicators, as they can determine secondary systemic lesions, associated to the primary periodontal ones.

