
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Evaluarea efectelor chemoprolifactice și antioxidante ale unui produs natural cu conținut crescut de polifenoli în ateroscleroza indusă de boala parodontală prin stress oxidativ

Doctorand **Constantin-Tudor Dimitriu**

Conducător de doctorat Prof.dr. **Mihaela Băciuț**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	15
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	
1. Caracteristici generale ale bolii parodontale	19
1.1. Definiție și epidemiologie	19
1.2. Examinarea pacienților parodontopați	20
1.3. Manifestări clinice în boala parodontală	21
1.4. Mecanisme patogenetice implicate în boala parodontală	21
1.4.1. Bacteriile parodontopatogene	22
1.4.2. Inflamația în boala parodontală	23
1.4.2.1. Factori de virulență bacterieni	23
1.4.2.2. Factori imuno-inflamatori ai organismului gazdă	24
1.4.3. Răspunsurile imune ale organismului	27
1.4.4. Factori de risc locali și generali în apariția bolii parodontale	28
1.4.4.1. Factori de risc modificabili	28
1.4.4.2. Factori de risc nemodificabili	29
2. Boala parodontală și starea de sănătate generală a organismului	31
2.1. Asocierea dintre boala parodontală și afecțiunile sistemice	31
2.2. Boala parodontală, bolile cardiovasculare și ateroscleroza	32
2.3. Stressul oxidativ în boala parodontală și ateroscleroză	34
3. Mijloace de tratament în boala parodontală	35
3.1. Obiectivele tratamentului	35
3.2. Elaborarea unui plan terapeutic	35
3.3. Tratamentul non-chirurgical	36
3.4. Tratamentul chirurgical	36
3.5. Antioxidanții utilizați în tratamentul adjuvant al bolii parodontale	37
3.5.1. Mecanismele de neutralizare a stressului oxidativ	38
3.5.2. Substanțe antioxidante administrate în boala parodontală	38

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

1. Ipoteza de lucru/obiective	43
2. Metodologie generală	45
2.1. Introducere asupra diferitelor metode de inducere a bolii parodontale la animalele de experiență	45
2.2. Designul modelului experimental și loturile de animale	51
2.3. Inducerea bolii parodontale	51
2.4. Extractul de sâmburi de struguri	57
2.5. Dozarea markerilor de stress oxidativ	57
2.5.1. Malondialdehida	57
2.5.2. Glutacionul	58
2.6. Recoltarea aortei și a țesuturilor parodontale	59
2.7. Evaluarea histologică a probelor	62
2.8. Analiza statistică și interpretarea datelor	62
3. Studiul 1 – Evaluarea aterosclerozei într-un model experimental de boală parodontală indusă prin ligatură	63
3.1. Introducere	63
3.2. Ipoteza de lucru/obiective	65
3.3. Material și metodă	66
3.4. Rezultate	68
3.5. Discuții	78
3.6. Concluzii	79
4. Studiul 2 – Cercetarea efectelor unui extract de sâmburi de struguri asupra aterosclerozei provocate de boala parodontală indusă de ligatură	81
4.1. Introducere	81
4.2. Ipoteza de lucru/obiective	81
4.3. Material și metodă	82
4.4. Rezultate	82
4.5. Discuții	92
4.6. Concluzii	93
5. Studiul 3 - Analiza efectelor unui extract de sâmburi de struguri într-un model experimental de boală parodontală	95
5.1. Introducere	95
5.2. Ipoteza de lucru/obiective	96
5.3. Material și metodă	97
5.4. Rezultate	98
5.5. Discuții	103
5.6. Concluzii	105

6. Concluzii generale	107
7. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	109
REFERINȚE	111

Cuvinte cheie: boala parodontală, ateroscleroză, stress oxidativ, inflamație, antioxidanți, polifenoli, șobolani Wistar.

INTRODUCERE

Boala parodontală reprezintă una dintre cele mai frecvente afecțiuni ale cavității orale care afectează țesuturile de sprijin dentare cu implicații negative asupra funcțiilor aparatului dentomaxilar.

În anii recenti, numeroase studii au propus o legătură între boala parodontală și alte afecțiuni generale, cum ar fi diabetul, bolile respiratorii și neurologice, artritele, sarcina și bolile cardiovasculare. Complicațiile inerente ale bolii parodontale manifestate atât local, cât și sistemic stârnesc un interes major din partea comunității medicale în încercarea de a elucida patogeniza complexă și multiplele interacțiuni dintre boala parodontală și patologii sistemice cu care aceasta se asociază. Din cauza factorilor de risc comuni pe care bolile cardiovasculare și boala parodontală îi împărtășesc, dintre care putem enumera fumatul, obezitatea, vârsta, diabetul zaharat, precum și a morbidităților asociate acestor afecțiuni, se desfășoară intense activități de cercetare clinică și experimentală pentru a identifica mecanismele etiopatogenetice și posibile noi tratamente.

Inflamația și stressul oxidativ rezultate din leziunile inflamatorii și bacteriene parodontale joacă un rol major în inițierea și în progresia atât a bolii parodontale, cât și a leziunilor aterosclerotice. Pe lângă acestea s-au identificat bacterii specifice parodontopatogene în grosimea arterelor afectate de ateroscleroză care provoacă și întrețin o stare de inflamație vasculară responsabilă de inițierea proceselor de depunere lipidică și a fenomenelor trombotice.

Pentru studierea mecanismelor patogenetice și a noi abordări terapeutice în boala parodontală și a efectelor sale sistemice, în literatura de specialitate sunt descrise numeroase modele experimentale de inducere a bolii parodontale la animalele de laborator prin intermediul aplicării unor ligaturi circumdentare. Utilizarea ca tratament adjuvant terapiei clasice parodontale, chirurgicală sau non-chirurgicală, a unor compuși cu efecte antioxidante și antiinflamatoare cu scopul de a bloca lanțul patogenetic al inflamației și a stressului oxidativ fac subiectul cercetării actuale în domeniul parodontologiei.

În lucrarea de față am pornit cercetările de la o incursiune în aspectele epidemiologice, clinice, patogenetice și terapeutice ale bolii parodontale.

Rezultatele obținute vin în întâmpinarea problemelor sistemice cauzate de boala parodontală și creează noi direcții de cercetare în vederea optimizării tratamentului parodontal și a afecțiunilor cardiovasculare.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

În literatură de specialitate există o serie de publicații care arată că se poate induce boală parodontală la șobolanii de experiență prin aplicarea și menținerea unei ligaturi la nivelul molarilor inferiori sau a incisivilor frontali superiori timp de 2-4 săptămâni¹. Având o importantă componentă inflamatorie, a fost studiat și stressul oxidativ în boala parodontală și s-a demonstrat că este implicat în retracția gingivală, resorbția osoasă și formarea de leziuni aterosclerotice la nivelul arterelor animalelor de experiență^{2,3,4}.

Boala parodontală și bolile cardiovasculare, în cazul de față ateroscleroza, se află într-o legătură mediată de către procesele inflamatorii. Proteina C reactivă (PCR) este o proteină de fază acută, un marker fidel și dinamic al inflamației și un agent proinflamator care induce o creștere a numărului de leucocite polimorfonucleare, fiind un factor de risc cunoscut pentru bolile cardiovasculare. O serie de studii și observații clinice au arătat că nivelurile crescute ale PCR din țesuturile parodontale sunt asociate cu niveluri serice crescute ale acesteia la pacienții cu boli cardiovasculare⁵. Pe lângă acestea, PCR intervine în procesele de opsonizare a LDL-colesterolului, astfel fiind implicată în procesul de captare a LDL de către macrofage și apariția de celule spumoase, cu rol dovedit în formarea ateroamelor⁶. Polimorfonuclearele sunt responsabile de eliberarea unei cantități sporite de citokine care mediază apariția leziunilor prin mecanism oxidativ de la nivelul endoteliului vascular. Aceste leziuni facilitează depunerea de colesterol și formarea plăcilor aterosclerotice^{7,8}.

Bacteriile parodontopatogene, dintre care cele mai reprezentative sunt *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forythia*, pot ajunge pe cale sanguină din pungile parodontale până la nivelul leziunilor endoteliale din arterele mari unde determină reacții inflamatorii și produc stress oxidativ. Aceste procese vor avea ca efect final acumularea de lipide în endoteliul vascular^{4,9}.

O serie de studii au arătat că un aport crescut de fructe și legume proaspete ar avea efecte benefice în terapia non-chirurgicală a bolii parodontale prin scăderea indicelui de adâncime la sondare. Acestea s-ar explica prin neutralizarea stressului oxidativ de la nivelul țesuturilor parodontale datorită aportului de antioxidanți din alimentație^{10,11}. În plus, există evidențe că terapia non-chirurgicală parodontală, reprezentată de detartraj supra și subgingival, igienizări profesionale și instructaj de igienă orală a dus la creșterea statusului antioxidant salivar și ameliorarea clinică a parodonțiului¹². Asocierea terapiei parodontale non-chirurgicale cu administrarea orală de produși cu proprietăți antioxidante a dus la rezultate încurajatoare privind reducerea statusului oxidant și ameliorarea clinică a parodonțiului, dar sunt necesare studii multicentrice suplimentare pentru a stabili aceste rezultate¹³.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Teza de doctorat conține trei studii principale. Primul studiu a avut ca obiective inducerea bolii parodontale la șobolani Wistar, evaluarea leziunilor tisulare gingivale

și evaluarea microscopică a fragmentelor de aortă în vederea identificării lipidelor. Cel de-al doilea studiu a urmărit aprecierea efectelor administrării unui extract de sămburi de stuguri, un produs natural cu conținut crescut de polifenoli, asupra stressului oxidativ, inflamației, leziunilor vasculare și depozitelor lipidice de la nivelul aortelor. Al treilea studiu s-a axat pe evaluarea efectelor extractului asupra inflamației, stressului oxidativ și leziunilor tisulare parodontale.

Metodologie generală

Pentru realizarea primului, a celui de-al doilea, dar și a celui de-al treilea studiu au fost utilizați 30 de șobolani rasă Wistar Albino. Animalele au fost în vârstă de 6 luni, cântărind aproximativ 350 ± 50 grame. Animalele au fost ținute în număr de 5 per cușcă în condiții standard de laborator. Animalele au avut acces la apă și hrană solidă ad libitum și au fost lăsate o săptămână în aceste condiții ca să se adapteze, înainte de începerea experimentului. Acestea au fost cântărite înainte și după aplicarea ligaturii. Nu au fost observate modificări în ceea ce privește greutatea lor. Modelul experimental a fost realizat în concordanță cu normele de etică și a fost aprobat de către Comisia de Etică a Universității de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca, România, număr de autorizație 377/16.10.2018 și a DSVSA Cluj, număr de autorizație 138/13.11.2018. Animalele de experiență au fost împărțite aleator în trei loturi a câte 10: Lotul Martor, Lotul cu Boală parodontală, care au primit prin gavaj la trei zile 0.5 ml ser fizologic, Lotul cu Boală parodontală și administrare de extract de sămburi de struguri, care a fost administrat în cantitate de 0.5 ml la fiecare trei zile prin gavaj.

Boala parodontală a fost indusă prin aplicarea unei ligaturi de sârmă în jurul coletului primului molar mandibular și a fost menținută timp de 4 săptămâni.

Studiul 1. Evaluarea aterosclerozei într-un model experimental de boală parodontală indusă prin ligatură

În anii recentți a fost propusă o legătură între boala parodontală și bolile cardiovasculare care este mediată de inflamație și stressul oxidativ. Obiectivele acestui studiu au fost de a demonstra că aplicarea unei ligaturi de sârmă în jurul primului molar mandibular la șobolanii Wistar provoacă inflamație la nivelul parodontiului, precum și depozite lipidice în aortă, via stress oxidativ.

Retracția ginigvală s-a determinat prin măsurarea pierderii de atașament epitelial. S-au determinat nivelurile de malondialdehidă (MDA) din omogenatul tisular aortic. Depozitele lipidice au fost evaluate utilizând colorația Oil Red și tehnici de imunofluorescență cu ajutorul microscopiei confocale. Cantitatea totală de lipide prezenta în aortă a fost măsurată prin morfometrie asistată de calculator.

Retracții gingivale semnificative au fost observate la lotul cu Boală parodontală în comparație cu lotul Martor. Niveluri crescute de MDA au fost identificate în aorta animalelor ligaturate comparativ cu cele din lotul Martor. Depozite semnificative de lipide au fost observate în aorta șobolanilor cu Boală parodontală față de cei din lotul Martor.

Aplicarea ligaturii de sârmă circumdentar produce retracții gingivale, niveluri crescute de stress oxidativ și depozite de lipide la nivelul aortei animalelor de experiență.

Studiul 2. Cercetarea efectelor unui extract de sâmburi de struguri asupra aterosclerozei provocate de boala parodontală indusă de ligatură

Asocierea dintre boala parodontală și bolile cardiovasculare a fost studiată intens în ultimii ani. Stressul oxidativ este implicat în inițierea și progresia leziunilor parodontale, dar și a aterosclerozei. Antioxidanții pot reduce efectele stressului oxidativ din bolile inflamatorii. Obiectivele studiului au fost de a evalua efectele unui extract de sâmburi de struguri (ESS), cu conținut crescut de antioxidanți, asupra aterosclerozei provocate de boala parodontală indusă de ligatura de sârmă circumdentară.

În zilele 1, 7 și 28, s-au recoltat probe biologice sanguine în vederea determinării stressului oxidativ și a inflamației (MDA, GSH, PCR) și lipidelor. În ziua 28 s-a realizat evaluarea histopatologică a aortei.

În ziua 7, MDA a prezentat valori semnificativ mai crescute la lotul cu Boală parodontală comparativ cu celelalte două loturi. În zilele 1 și 7, nivelurile de glutation (GSH) au fost semnificativ mai mari la loturile Martor și la animalele care au primit extractul de sâmburi de struguri comparativ cu cele din lotul cu Boală parodontală, iar în ziua 28, au fost semnificativ mai crescute la animalele la care s-a administrat extractul versus cele din lotul cu Boală parodontală. Proteina C reactivă (PCR) a fost semnificativ mai mărită la lotul cu Boală parodontală în zilele 1 și 7, comparativ cu celelalte două loturi. În ziua 28, colesterolul a fost semnificativ mai redus la animalele din loturile Martor și cele care au primit extractul față de cele din lotul Boală parodontală. Totodată, nivelurile de HDL colesterol au fost semnificativ mai mari la animalele la care s-a administrat extractul de sâmburi de struguri comparativ cu cele cu Boală parodontală.

Administrarea prin gavaj a extractului de sâmburi de struguri reduce stressul oxidativ, inflamația și ateroscleroza de la nivelul aortei într-un model experimental de boală parodontală și ateroscleroză induse de ligatura de sârmă.

Studiul 3. Analiza efectelor unui extract de sâmburi de struguri într-un model experimental de boală parodontală

Scopul acestui studiu a fost de a evalua efectele administrării unui extract de sâmburi de struguri, bogat în polifenoli, asupra bolii parodontale induse prin ligatură de sârmă la șobolani Wistar.

În zilele 1, 7 și 28, s-au recoltat probe biologice sanguine, iar în ziua 28 s-au recoltat hemimandibulele care au fost apoi trimise pentru examen histopatologic. Valorile GSH și MDA au fost dozate din sânge și țesutul parodontal.

Valori semnificativ mai crescute de MDA au fost observate în sângele și parodontiul animalelor din lotul cu Boală parodontală față de cele din lotul care a

primit extractul. Administrarea extractului a dus la o creștere a nivelurilor plasmaticice de GSH comparativ cu cele din celelalte două loturi. Inflamația parodontală și necroza osoasă observate histologic au fost semnificativ mai reduse la animalele care au primit extractul de sâmburi de struguri comparativ cu cele din lotul cu Boală parodontală.

Extractul de sâmburi de struguri a avut efecte protective antiinflamatorii și antioxidante într-un model experimental de boală parodontală indusă de ligatura de sârmă și, totodată, a dus la îmbunătățirea statusului histologic a parodonțiului și a osului alveolar la animalele la care s-a administrat.

ORIGINALITATEA ȘI CONTRIBUȚIILE INOVATIVE ALE TEZEI

În literatura de specialitate există descrise numeroase metode de inducere a bolii parodontale prin utilizarea a diferite materiale pentru ligatură și a diferitelor zone de aplicare a acestora, dar nu am găsit studii care să utilizeze tehnica descrisă și utilizată în această teză.

În primul studiu am reușit să inducem boala parodontală. Prin efectele proinflamatorii și pro-oxidante ale acesteia au fost declanșate depunerile de lipide de la nivelul aortei. Aceste rezultate reprezintă o direcție de cercetare de urmat pe viitor și oferă un model experimental valid care să permită elucidarea mai precisă a mecanismelor etiopatogenetice implicate în apariția bolii parodontale, dar și în inițierea aterogenezei indusă de boala parodontală.

În cel de-al doilea studiu, administrarea unui extract de sâmburi de struguri a fost responsabilă de reducerea peroxidării lipidice, scăderea markerilor de stress oxidativ și inflamație, creșterea capacității antioxidante a organismului și scăderea nivelului de colesterol total cu mărirea HDL-ului. Astfel s-a reușit combaterea efectelor stressului oxidativ și ale inflamației răspunzătoare de inițierea aterogenezei.

În al treilea studiu s-au demonstrat efectele antioxidante și antiinflamatoare ale extractului într-un model experimental de boală parodontală, prin reducerea inflamației sistemice și locală parodontală și controlul leziunilor histologice ale parodonțiului.

Rezultatele obținute în cadrul acestei teze constituie un punct de plecare pentru cercetări ulterioare îndreptate spre găsirea de noi mijloace de tratament al bolii parodontale și optimizarea strategiilor terapeutice deja existente, prin eventuala suplimentare a acestora cu produse naturale cu proprietăți antiinflamatoare și antioxidante. Nu în ultimul rând, aceste produse ar putea fi utilizate și în managementul pacienților cu afecțiuni cardiovasculare, întrucât rezultatele noastre favorizează ipoteza că administrarea extractelor de sâmburi de struguri duce la îmbunătățirea statusului vascular și reducerea efectelor dăunătoare cauzate de stressul oxidativ.

Așadar, în urma evaluării efectelor administrării unui extract de sâmburi de struguri cu conținut crescut de polifenoli putem afirma că acesta a demonstrat proprietăți chemoprotective, antioxidante și antiinflamatoare într-un model experimental de ateroscleroză și boală parodontală indusă de ligatură.

Ținând cont de prevalența și morbiditățile crescute ale bolii parodontale și a patologiei cardiovasculare, dar și a legăturii dintre acestea, considerăm importantă

educarea medicală continuă a specialiștilor din domeniul medicinei dentare și a cardiologiei și propunerea creării unor punți între aceste discipline în vederea unui management terapeutic care să se adreseze factorilor de risc comuni, dar și componentei inflamatorii din sfera orală și a celei sistemice.

REFERINȚE SELECTIVE

1. Chumakova Y, Vishnevskaya A, Kakabadze A, Karalashvili L, Kakabadze Z. Clinical and biochemical analysis of ligature-induced periodontitis in rats. *Georgian Med News*. 2014 Oct;(235):63-9.
2. Shen YX, Guo SJ, Wu YF. Oxidative stress and antioxidant therapy of chronic periodontitis. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*. 2016 Jul;51(7):442-6.
3. Liu Z, Liu Y, Song Y, Zhang X, Wang S, Wang Z. Systemic oxidative stress biomarkers in chronic periodontitis: a meta-analysis. *Dis Markers*. 2014;2014:931083.
4. Ekuni D, Tomofuji T, Sanbe T, Irie K, Azuma T, Maruyama T, Tamaki N, Murakami J, Koikeguchi S, Yamamoto T. Periodontitis-induced lipid peroxidation in rat descending aorta is involved in the initiation of atherosclerosis. *Journal of Periodontology*, 2009 44(4): 434-42.
5. Kumar KR, Ranganath V, Naik R, Banu S, Nichani AS. Assesment of high-sensitivity C-reactive protein and lipid levels in healthy adults and patients with coronary artery disease, with and without periodontitis – a cross-sectional study. *Journal of Periodontal Research*, 2014.
6. Venugopal S, Devaraj S, Jialal I. Macrophage conditioned medium induces the expression of C-reactive protein in human aortic endothelial cells: potential for paracrine/autocrine effects. *Am J Pathol* 2005;166:1265-1271.
7. Bozoglan A, Ertugrul AS, Taspınar M, Yuzbasioglu B. Determining the relationship between atherosclerosis and periodontopathogenic microorganisms in chronic periodontitis patients. *Acta Odontol Scand*. 2017 May;75(4):233-242.
8. Cochran DL. Inflammation and bone loss in periodontal disease. *J periodontol* 2008 (suppl); 79:1569-1576.
9. Xiuyun R, Chong W, Xin L, Hao L, Qianhui M, Mu L, Xuexue S, Jinhua G1. Effects of oral interventions on carotid artery in rats with chronic periodontitis for the detection of *Porphyromonas gingivalis* and the expression of C-reactive protein. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*. 2017 Apr 1;35(2):192-197.
10. Muniz FW, Nogueira SB, Mendes FL, Rösing CK, Moreira MM, de Andrade GM, Carvalho Rde S. The impact of antioxidant agents complimentary to periodontal therapy on oxidative stress and periodontal outcomes: A systematic review. *Arch Oral Biol*. 2015 Sep;60(9):1203-14.
11. Dodington DW, Fritz PC, Sullivan PJ, Ward WE. Higher Intakes of Fruits and Vegetables, β -Carotene, Vitamin C, α -Tocopherol, EPA, and DHA Are Positively Associated with Periodontal Healing after Nonsurgical Periodontal Therapy in Nonsmokers but Not in Smokers. *J Nutr*. 2015 Nov;145(11):2512-9;
12. Novaković N, Cakić S, Todorović T, Raicević BA, Dozić I, Petrović V, Perunović N, Gostović SS, Sretenović JK, Colak E. Antioxidative status of saliva before and after non-surgical periodontal treatment. *Srp Arh Celok Lek*. 2013 Mar-Apr;141(3-4):163-8.
13. Chapple IL, Milward MR, Ling-Mountford N, Weston P, Carter K, Askey K, Dallal GE, De Spirt S, Sies H, Patel D, Matthews JB. Adjunctive daily supplementation with encapsulated fruit, vegetable and berry juice powder concentrates and clinical periodontal outcomes: a double-blind RCT. *J Clin Periodontol*. 2012 Jan;39(1):62-7.

SUMMARY OF THE PhD THESIS

The evaluation of the chemoprophylactic and antioxidant effects of a natural compound with high content of polyphenols in periodontitis induced atherosclerosis through oxidative stress

PhD Student **Constantin-Tudor Dimitriu**

PhD Scientific Coordinator Prof.dr. **Mihaela Băciuț**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION	15
CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	
1. General characteristics of periodontitis	19
1.1. Definition and epidemiology	19
1.2. Periodontitis patients examination	20
1.3. Clinical manifestations in periodontitis	21
1.4. Pathogenetic mechanisms involved in periodontitis	21
1.4.1. Periodontal disease bacteria	22
1.4.2. Inflammation and periodontitis	23
1.4.4.3. Bacterial aggression factors	23
1.4.4.4. Host immune and inflammatory factors	24
1.4.5. Host immune responses	27
1.4.6. Local and general risk factors in the initiation of periodontitis	28
1.4.6.1. Alterable risk factors	28
1.4.6.2. Non-alterable risk factors	29
2. Periodontal disease and the general health	31
2.4. The association between periodontitis and systemic diseases	31
2.5. Periodontitis, cardiovascular diseases and atherosclerosis	32
2.6. Oxidative stress in periodontitis and atherosclerosis	34
3. Treatment principles in periodontal disease	35
3.1. Periodontal treatment objectives	35
3.2. Designing a treatment plan	35
3.3. Non-surgical treatment	36
3.4. Surgical treatment	36
3.5. Antioxidants used in the adjuvant treatment of periodontitis	37
3.5.1. Neutralisation pathways of oxidative stress	38
3.5.2. Antioxidants administered in periodontitis	38

PERSONAL CONTRIBUTION

1. Work hypothesis/ objectives	43
2. General methodology	45
2.9. Introduction on different methods of inducing experimental periodontitis	45
2.10. Experimental periodontitis protocol design	51
2.11. Induction of periodontitis	51
2.12. The grape seed extract	57
2.13. Oxidative stress parameters	57
2.13.1. Malondialdehyde	57
2.13.2. Glutathione	58
2.14. Aorta and periodontal tissue harvesting	59
2.15. Histopathological analysis of tissues	62
2.16. Statistic analysis and interpretation of data	62
3. Study 1 – Ligature induced periodontitis causes atherosclerosis in rat descending aorta: an experimental study	63
3.1. Introduction	63
3.2. Work hypothesis/objectives	65
3.3. Material and method	66
3.4. Results	68
3.5. Discussions	78
3.6. Conclusions	79
4. Study 2 – Grape seed extract reduces the degree of atherosclerosis in ligature-induced periodontitis in rats: an experimental study	81
4.1. Introduction	81
4.2. Work hypothesis/objectives	81
4.3. Material and method	82
4.4. Results	82
4.5. Discussions	92
4.6. Conclusions	93
5. Study 3 – The effects of a grape seed extract on ligature induced-periodontitis in rats: an experimental study	95
5.1. Introduction	95
5.2. Work hypothesis/objectives	96
5.3. Material and method	97
5.4. Results	98
5.5. Discussions	103
5.6. Conclusions	105

6. General conclusions	107
7. Originality and innovative contributions of the PhD thesis	109
REFERENCES	111

Key words: periodontitis, atherosclerosis, oxidative stress, inflammation, antioxidants, polyphenols, Wistar rats.

INTRODUCTION

Periodontitis is one of the most common diseases of the oral cavity that affects the supporting tissues of the teeth with negative implications on the functions of the dentomaxillary apparatus.

In recent years, a number of studies have proposed a link between periodontitis and other general conditions such as diabetes, respiratory and neurological diseases, arthritis, pregnancy and cardiovascular diseases. The inherent complications of periodontitis that manifest themselves both a local and systemic levels cause a major interest on behalf of the medical community in the hope of elucidating the complex pathogenesis and the multiple interactions between periodontitis and the systemic diseases with which it is associated. Due to the common risk factors that periodontitis and cardiovascular diseases share, of which we can enumerate smoking, obesity, age, diabetes and also the associated morbidities of these conditions, intense clinical and experimental research is being performed to identify the ethiopathogenetic mechanisms and new possible treatment options.

The inflammation and oxidative stress resulting from the bacterial and inflammatory injuries play an important role in the initiation and progression of periodontitis and also atherosclerosis. Periodontitis specific bacteria were found in the walls of arteries that were affected by atherosclerosis. These bacteria cause and maintain a status of vascular inflammation that is responsible for the initiation of lipid accumulation processes and thrombotic events.

For the purpose of studying the pathogenetic mechanisms and new therapeutic approaches of periodontitis and its systemic effects, a number of studies described ways of inducing experimental periodontitis in laboratory animals by applying ligatures around teeth. The use of antioxidant compounds with anti-inflammatory properties as an adjuvant of the classic periodontal treatment or surgical/non-surgical treatment, with the purpose of blocking the pathogenetic chain of inflammation and oxidative stress, is in the focus of many recent researches in the field of periodontology.

In this PhD thesis we began our research from an incursion into the epidemiologic, clinic, pathogenetic and therapeutic aspects of periodontal diseases.

Our research addresses the systemic problems caused by periodontitis and forge new research pathways towards optimising the treatment of periodontitis and cardiovascular diseases.

CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

In the scientific literature there are a series of articles demonstrating that periodontitis can be induced in Wistar rats by affixing a ligature around the cervix of the inferior molars or frontal incisors and keeping it in place for 2 to 4 weeks¹. The oxidative stress is studied due to the important part it plays in periodontitis and it has been shown that it is involved in gingival recession, bone resorption and the formation of atherosclerotic lesions in the arteries of laboratory animals^{2,3,4}.

Periodontitis and cardiovascular diseases, including atherosclerosis, are linked by inflammatory processes. C reactive protein (CRP) is an acute phase protein, an accurate and dynamic marker of inflammation and a proinflammatory agent which causes a rise in the number of polymorphonuclear leucocytes, and also a known risk factor for cardiovascular diseases. A series of studies and clinical observations showed that the high levels of CRP from the periodontal tissues are associated with high CRP values in patients suffering from cardiovascular diseases⁵. Besides these, CRP is involved in the opsonisation of LDL-cholesterol, thus being responsible for the capturing of LDL-cholesterol by the macrophages and the formation of foam cells, which have a proven role in the formation of atheromas⁶.

Polymorphonuclear cells are responsible for the releasing of an increased quantity of cytokines that mediate the apparition of injuries in the vascular endothelium through oxidative mechanisms. These lesions facilitate the cholesterol accumulation and the formation of atherosclerotic plaques^{7,8}.

Periodontitis specific bacteria, out of which the most representative are *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forythia*, can reach the endothelial lesions through the blood stream, where they cause local inflammatory responses and oxidative stress. These processes have a final result the accumulation of lipids in the vascular endothelium^{4,9}.

A number of studies have shown that a rich intake of fresh fruits and vegetables have beneficial effects in the non-surgical treatment of periodontitis by lowering the probing depth index. These findings could be explained by neutralising the oxidative stress in the periodontal tissues due to the intake of alimentary antioxidants^{10,11}. There are also evidences that periodontal non-surgical treatment, represented by supra and subgingival scaling and oral hygiene instructions, have led to an increase of salivary antioxidant status and the clinical improvement of the periodontal tissues¹². The association of periodontal non-surgical therapy with the oral administration of antioxidant and anti-inflammatory substances revealed encouraging results regarding the amelioration of the oxidative status and clinical improvement of the periodontium, but additional multicentric studies are necessary to consolidate these findings¹³.

PERSONAL CONTRIBUTION

The PhD thesis contains three major studies, the first of which had the objectives of inducing periodontal disease in Wistar rats, evaluating the periodontal lesions and microscopic investigation of the aorta to identify lipid deposits. The second study was aimed at the appreciation of the effects of administering a grape seed extract, a natural substance with high content of polyphenols, on oxidative stress, inflammation, vascular damage and lipid accumulation in the aorta. The third study was focused on determining the effects of the grape seed extract on inflammation, oxidative stress and periodontal tissue injuries.

General methodology

For the realisation of the first, second, but also the third study 30 male Wistar Albino rats were used. The animals were 6 months old, weighing in at approximately 350 ± 50 gramms. 5 animals were kept in each cage in standard laboratory conditions, with free acces to food and tap water. They were also given one week to settle in before the experiment began. The rats were weighed before and after the ligature was placed. No weight loss was recorded. The experimental model was performed according to the ethic rules and regulations and was approved by the Ethical Comission of the University of Medicine and Pharmacy „Iuliu Hațieganu”, Cluj-Napoca, Romania, authorisation number 377/16.10.2018, and also DSVSA Cluj, authorisation number 138/13.11.2018. The animals were randomly divided into three groups of 10: Control Group, Periodontitis group, which were administered every three days 0.5 ml of saline, Periodontitis group fed with the grape seed extract that received 0.5 ml of extract every three days by gavage.

Periodontitis was induced by affixing a wire ligature around the cervix of the first mandibular molar which was kept in place for 4 weeks.

Study 1. Ligature induced periodontitis causes atherosclerosis in rat descending aorta: an experimental study

In recent years a link between periodontitis and cardiovascular diseases, mediated by oxidative stress and inflammation, was proposed. The objectives of this study were to demonstrate that the affixing of a wire ligature around the first mandibular molar causes periodontal inflammation and lipid deposits in the aorta of Wistar rats, via oxidative stress.

Gingival recession was determined by measuring the clinical attachment loss. MDA values were determined from the aortic tissue homogenate. The lipid deposits were evaluated using Oil Red staining and immunofluorescence under confocal microscopy. The total lipid content in the aorta was assessed using a computer assisted morphometry system.

Significant gingival recession was observed in the Periodontitis group in comparison with the Control group. Increased MDA levels were present in the aorta in

the ligatured rats in comparison with the Control group. Significant lipid deposits were observed in the aorta of the Periodontitis group as opposed to the Control group.

The affixing of an orthodontic wire ligature produces gingival recession, increased oxidative stress and lipid deposits in the rat descending aorta.

Study 2. Grape seed extract reduces the degree of atherosclerosis in ligature-induced periodontitis in rats: an experimental study

The associations between periodontitis and cardiovascular diseases have been intensely studied in recent years. Oxidative stress is involved in the initiation and progression of periodontitis and atherosclerosis. Antioxidants can reduce the effects of oxidative stress on inflammatory diseases. Our aim was to measure the effects of a grape seed extract (GSE), rich in antioxidants, on atherosclerosis caused by ligature-induced periodontitis in rats.

At days 1, 7, 28, blood samples were harvested to determine oxidative stress and inflammation markers and to determine the lipid profile. At day 28, histopathological examination of the aorta was performed.

MDA was significantly higher in Periodontitis group compared to the other groups only at day 7. GSH was significantly increased in the Control and Periodontitis fed with GSE groups on days 1 and 7, compared to Periodontitis group and on day 28 higher in the group fed with GSE vs. Periodontitis groups. C reactive protein was significantly increased in the Periodontitis group on days 1 and 7 compared to both groups. Cholesterol was significantly decreased in the aortas of the animals the received GSE at day 28 compared to the Periodontitis group. HDL cholesterol was significantly higher in the group that received the grape seed extract compared to the other two groups.

Oral administration of a grape seed extract reduces the oxidative stress, inflammation and atherosclerosis in a rat model of ligature-induced periodontitis.

Study 3. The effects of a grape seed extract on ligature induced - periodontitis in rats: an experimental study

The objective of this study was to evaluate the effects of administering a grape seed extract, rich in polyphenols in an experimental model of ligature induced periodontitis in rats.

At days 1, 7 and 28, blood samples were taken and at day 28, the hemimandibles were harvested and sent for histological examination. GSH and MDA were determined in serum and in gingival tissue.

Significantly higher values of MDA were found in serum and periodontium in the Ligature group in comparison to the animals that were administered the extract. GSE administration resulted in an increase of GSH plasma concentration in the Periodontitis group fed with GSE as compared to the Control and Ligature groups. In

the group fed with GSE inflammation and bone involvement were less marked than in the Ligature group.

The grape seed extract proved protective anti-inflammatory and antioxidant effects in a ligature-induced experimental model of periodontitis in rats and also improved the histological status of gingival tissue and bone.

ORIGINALITY AND INNOVATIVE CONTRIBUTIONS OF THE PhD THESIS

In the literature there are descriptions of a number of ways to induce experimental periodontitis utilising different materials for the ligature and different sites to place the ligature, but we did not find any studies that use the technique described and used in this thesis.

In the first study we managed to induce periodontitis. Through its proinflammatory and pro-oxidant effects lipid accumulation was initiated in the aorta. These results represent a research pathway that can be followed in the future and also give to the research community a viable experimental model of periodontitis and atherosclerosis that allows a better and precise study of the etiopathogenetic mechanisms involved in the onset of periodontitis and periodontitis induced atherogenesis.

In the second study we showed that the administration of a grape seed extract was responsible for reducing lipid peroxidation, the decrease of oxidative stress and inflammation markers, the increase of the hosts antioxidant capacity and the lowering of cholesterol, in the same time increasing the HDL cholesterol levels. Thus, the deleterious effects of oxidative stress and inflammation that cause the onset of atherosclerosis were countered.

In the third study the antioxidant and anti-inflammatory effects of the grape seed extract were demonstrated by the reduction in the levels of systemic and local periodontal inflammation and the amelioration of the periodontal tissues injuries.

The results of this thesis represent a starting point for further research directed towards finding new ways in the management of periodontal disease and optimising the treatment strategies already existent by the possible supplementation of these with natural substances with anti-inflammatory and antioxidant properties. Also, these substances could be used in the treatment of patients with cardiovascular diseases due to the fact that our results point out to the hypothesis that the administration of a grape seed extract leads to the improvement of the vascular status and the decrease of the negative effects caused by oxidative stress.

Therefore, after evaluating the effects of administering a grape seed extract with high content in polyphenols we can argue that this extract has proven chemoprophylactic, antioxidant and anti-inflammatory properties in an experimental model of ligature induced periodontitis and atherosclerosis.

Keeping in mind the increased prevalence and morbidities of periodontitis and cardiovascular diseases, but also the fact that these two are linked, we consider of

significant importance the continuous education of dental medicine practitioners and cardiologists and the creation of communication and medical information bridges between these specialities with the purpose of elaborating a treatment plan that addresses the common risk factors shared by these diseases, but also the inflammatory component of oral cavity and systemic diseases.

SELECTIVE REFERENCES

1. Chumakova Y, Vishnevskaya A, Kakabadze A, Karalashvili L, Kakabadze Z. Clinical and biochemical analysis of ligature-induced periodontitis in rats. *Georgian Med News*. 2014 Oct;(235):63-9.
2. Shen YX, Guo SJ, Wu YF. Oxidative stress and antioxidant therapy of chronic periodontitis. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*. 2016 Jul;51(7):442-6.
3. Liu Z, Liu Y, Song Y, Zhang X, Wang S, Wang Z. Systemic oxidative stress biomarkers in chronic periodontitis: a meta-analysis. *Dis Markers*. 2014;2014:931083.
4. Ekuni D, Tomofuji T, Sanbe T, Irie K, Azuma T, Maruyama T, Tamaki N, Murakami J, Kokeguchi S, Yamamoto T. Periodontitis-induced lipid peroxidation in rat descending aorta is involved in the initiation of atherosclerosis. *Journal of Periodontology*, 2009 44(4): 434-42.
5. Kumar KR, Ranganath V, Naik R, Banu S, Nichani AS. Assesment of high-sensitivity C-reactive protein and lipid levels in healthy adults and patients with coronary artery disease, with and without periodontitis – a cross-sectional study. *Journal of Periodontal Research*, 2014.
6. Venugopal S, Devaraj S, Jialal I. Macrophage conditioned medium induces the expression of C-reactive protein in human aortic endothelial cells: potential for paracrine/autocrine effects. *Am J Pathol* 2005;166:1265-1271.
7. Bozoglan A, Ertugrul AS, Taspinar M, Yuzbasioglu B. Determining the relationship between atherosclerosis and periodontopathogenic microorganisms in chronic periodontitis patients. *Acta Odontol Scand*. 2017 May;75(4):233-242.
8. Cochran DL. Inflammation and bone loss in periodontal disease. *J periodontol* 2008 (suppl); 79:1569-1576.
9. Xiuyun R, Chong W, Xin L, Hao L, Qianhui M, Mu L, Xuexue S, Jinhua G1. Effects of oral interventions on carotid artery in rats with chronic periodontitis for the detection of *Porphyromonas gingivalis* and the expression of C-reactive protein. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*. 2017 Apr 1;35(2):192-197.
10. Muniz FW, Nogueira SB, Mendes FL, Rösing CK, Moreira MM, de Andrade GM, Carvalho Rde S. The impact of antioxidant agents complementary to periodontal therapy on oxidative stress and periodontal outcomes: A systematic review. *Arch Oral Biol*. 2015 Sep;60(9):1203-14.
11. Dodington DW, Fritz PC, Sullivan PJ, Ward WE. Higher Intakes of Fruits and Vegetables, β -Carotene, Vitamin C, α -Tocopherol, EPA, and DHA Are Positively Associated with Periodontal Healing after Nonsurgical Periodontal Therapy in Nonsmokers but Not in Smokers. *J Nutr*. 2015 Nov;145(11):2512-9;
12. Novaković N, Cakić S, Todorović T, Raicević BA, Dozić I, Petrović V, Perunović N, Gostović SS, Sretenović JK, Colak E. Antioxidative status of saliva before and after non-surgical periodontal treatment. *Srp Arh Celok Lek*. 2013 Mar-Apr;141(3-4):163-8.
13. Chapple IL, Milward MR, Ling-Mountford N, Weston P, Carter K, Askey K, Dallal GE, De Spirt S, Sies H, Patel D, Matthews JB. Adjunctive daily supplementation with encapsulated fruit, vegetable and berry juice powder concentrates and clinical periodontal outcomes: a double-blind RCT. *J Clin Periodontol*. 2012 Jan;39(1):6