

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE „IULIU HAȚIEGANU” CLUJ-NAPOCA

Rezumatul tezei de Doctorat

**CERCETĂRI PRIVIND ROLUL FACTORILOR IMUNI ÎN ETIOLOGIA BOLII  
PARODONTALE ȘI POSIBILITĂȚILE TERAPEUTICE**

Conducător științific:

Prof. Dr. **Radu Septimiu Câmpian**

Doctorand:

**Adina Bianca Boșca**

Cluj-Napoca 2012

**CUPRINS**

**ABREVIERI 12**

**INTRODUCERE 13**

**STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII 15**

**1. Date actuale privind clasificarea și etiopatogeneza bolii parodontale 17**

1.1. Clasificarea bolii parodontale. Forme clinice 17

1.2. Concepte actuale în etiopatogeneza bolii parodontale 18

1.2.1. Factorul determinant microbian 18

1.2.2. Factorii favorizanți locali 18

1.2.3. Factorii favorizanți generali 19

1.2.4. Mecanisme patogenetice în boala parodontală 19

1.2.4.1. Mecanisme patogenetice directe 19

1.2.4.2. Mecanisme patogenetice indirecte 19

**2. Aspecte histopatologice în boala parodontală 23**

2.1. Structura histologică a parodonțiului marginal 23

2.2. Instalarea și progresia bolii parodontale 27

2.3. Modificări histopatologice parodontale 27

2.3.1. Modificările de la nivelul parodonțiului superficial 27

2.3.2. Modificările de la nivelul parodonțiului profund 28

**3. Mijloace de diagnostic și modalități terapeutice nonchirurgicale în diferite forme de boală parodontală 28**

3.1. Mijloace actuale pentru diagnosticul bolii parodontale 28

3.2. Tratamentul parodontal convențional 30

3.3. Tratamentul medicamentos utilizat în parodontopatii 31

3.4. Tratamentul topic cu extracte vegetale 32

**CONTRIBUȚIA PERSONALĂ 33**

**1. Ipoteza de lucru. Obiective 35**

**2. Metodologie generală 37**

2.1. Metodologia pentru studiile clinice 37

2.1.1. Populația țintă 37

2.1.2. Metode utilizate 38

|   |           |
|---|-----------|
| 2.1.2.1. Examenul clinic parodontal   | 38        |
| 2.1.2.2. Prelevarea probelor biologice  | 39        |
| 2.1.2.3. Determinările imunologice  | 40        |
| 2.1.2.4. Examenul histopatologic  | 41        |
| 2.1.2.5. Metodele de obținere a preparatelor utilizate în tratament   | 42        |
| 2.1.2.6. Tratamentele efectuate   | 43        |
| 2.1.2.7. Analiza statistică   | 44        |
| 2.2. Metodologia pentru studiile experimentale  | 45        |
| 2.2.1. Animale utilizate  | 45        |
| 2.2.2. Metode utilizate   | 45        |
| 2.2.2.1. Inducerea patologiei   | 45        |
| 2.2.2.2. Examenul clinic  | 46        |
| 2.2.2.3. Prelevarea probelor biologice  | 46        |
| 2.2.2.4. Determinările imunologice  | 47        |
| 2.2.2.5. Examenul histopatologic  | 47        |
| 2.2.2.6. Metodele de obținere a preparatelor utilizate în tratament   | 48        |
| 2.2.2.7. Tratamentele efectuate   | 48        |
| 2.2.2.8. Analiza statistică   | 48        |
| <b>3. Studiul 1 – Evaluarea valorii diagnostice a nivelurilor salivare ale MMP-8 la pacienții cu parodontită cronică severă</b>                                       | <b>49</b> |
| 3.1. Introducere  | 49        |
| 3.2. Ipoteza de lucru. Obiective  | 50        |
| 3.3. Material și metodă   | 50        |
| 3.4. Rezultate  | 51        |
| 3.4.1. Rezultatele examenului clinic și ale determinărilor imunologice  | 51        |
| 3.4.2. Rezultatele examenului histopatologic  | 54        |
| 3.5. Discuții   | 62        |
| 3.6. Concluzii  | 65        |
| <b>4. Studiul 2 – Aprecierea eficienței tratamentului imunomodulator în parodontita cronică</b>   | <b>67</b> |
| 4.1. Introducere  | 67        |
| 4.2. Ipoteza de lucru. Obiective  | 68        |
| 4.3. Material și metodă   | 69        |
| 4.4. Rezultate  | 71        |
| 4.4.1. Rezultatele obținute la prima examinare  | 71        |
| 4.4.2. Rezultatele obținute la a doua examinare   | 72        |
| 4.4.3. Rezultatele obținute la a treia examinare  | 74        |
| 4.5. Discuții   | 78        |
| 4.6. Concluzii  | 80        |
| <b>5. Studiul 3 – Cercetări privind implicarea MMP-8 în patogeneza parodontitei cronice induse experimental</b>   | <b>81</b> |
| 5.1. Introducere  | 81        |
| 5.2. Ipoteza de lucru. Obiective  | 82        |
| 5.3. Material și metodă   | 82        |
| 5.4. Rezultate  | 83        |
| 5.4.1. Rezultatele examenelor clinic și histopatologic  | 83        |
| 5.4.2. Rezultatele determinărilor imunologice   | 89        |
| 5.5. Discuții   | 90        |
| 5.6. Concluzii  | 94        |
| <b>6. Studiul 4 – Evaluarea efectului imunomodulator al tratamentului general cu doze subantimicrobiene de Doxiciclină în parodontita cronică indusă experimental</b> | <b>95</b> |

|   |            |
|---|------------|
| 6.1. Introducere  | 95         |
| 6.2. Ipoteza de lucru. Obiective  | 95         |
| 6.3. Material și metodă   | 96         |
| 6.4. Rezultate  | 97         |
| 6.4.1. Rezultatele examenelor clinic și histopatologic  | 97         |
| 6.4.2. Rezultatele determinărilor imunologice   | 99         |
| 6.5. Discuții   | 103        |
| 6.6. Concluzii  | 104        |
| <b>7. Studiul 5 – Evaluarea tratamentului topic cu extracte vegetale în parodontita cronică indusă experimental</b> | <b>105</b> |
| 7.1. Introducere  | 105        |
| 7.2. Ipoteza de lucru. Obiective  | 106        |
| 7.3. Material și metodă   | 106        |
| 7.4. Rezultate  | 107        |
| 7.4.1. Rezultatele examenelor clinic și histopatologic  | 107        |
| 7.4.2. Rezultatele determinărilor imunologice   | 112        |
| 7.5. Discuții   | 116        |
| 7.6. Concluzii  | 118        |
| <b>8. Discuții generale</b>   | <b>119</b> |
| <b>9. Concluzii generale</b>  | <b>123</b> |
| <b>10. Originalitatea și contribuțiile inovatoare ale tezei</b>   | <b>125</b> |
| <b>REFERINȚE</b>  | <b>127</b> |
| <b>ANEXE</b>  | <b>137</b> |

**Cuvinte cheie:** Boala parodontală, metaloproteinaza matriceală 8, biomarker, leziuni tisulare colaterale, tratament imunomodulator.

## **INTRODUCERE**

Boala parodontală ar putea fi considerată o problemă globală de sănătate din perspectiva calității vieții deoarece afectează nu doar aparatul dento-maxilar, ci influențează starea de sănătate a întregului organism. Din acest motiv, diagnosticul precoce, controlul eficient și tratamentul corect al afecțiunii reprezintă țelul principal al medicilor parodontologi.

În etiologia parodontopatiilor rolul determinant revine factorului microbial, însă factorii imuni, printre care se numără și enzimele proteolitice endogene, au o influență hotărâtoare în instalarea, progresia și severitatea bolii. Cercetări recente au demonstrat că metaloproteinaza matriceală 8 (MMP-8) este enzima cu cel mai mare potențial distructiv asupra țesuturilor parodontale, fiind responsabilă de producerea de leziuni tisulare colaterale. Din aceste considerente, MMP-8 a fost desemnată biomarker-ul bolii parodontale și e candidatul principal în vederea conceperii unui instrument pentru diagnosticul obiectiv și a unor mijloace terapeutice imunomodulatoare, adjuvante tratamentului parodontal convențional. Studiul de față are ca scop continuarea cercetărilor pentru a clarifica unele aspecte legate de mecanismele patogenetice implicate în boala parodontală, și pentru a evalua modalitățile de diagnostic și posibilitățile terapeutice imunomodulatoare în diverse forme de afectare a parodonțiului.

## **CONTRIBUȚIA PERSONALĂ**

### **Studiile clinice**

#### **Ipoteza de lucru. Obiective**

În diagnosticul parodontitei cronice, măsurarea parametrilor clinici și investigațiile radiologice nu furnizează date suficiente, motiv pentru care aceste examinări trebuie completate cu anumite determinări imunologice care să cuantifice nivelul unor biomarkeri, cum ar fi MMP-8, în

fluidele orale. Totodată, este necesară o nouă abordare terapeutică adresată inhibării activității MMP-8, enzima cu cel mai intens efect colagenolitic asupra țesuturilor parodontale. Anumite antibiotice, în special Doxiciclina administrată pe cale generală în doze subantimicrobiene, au efect de inhibare a activității MMP-8. De asemenea, au fost propuse unele extracte vegetale, printre care cele pe bază de *Echinacea purpurea* și *Sambucus nigra* care, aplicate local, ar contribui la reducerea activității enzimatică.

Obiectivele pe care ni le-am propus sunt următoarele:

- Efectuarea unor investigații clinice, histopatologice și imunologice pe fondul parodontitei cronice.
- Evaluarea comparativă a profilului clinic și a valorilor MMP-8 salivare la pacienții parodontopați și la indivizii sănătoși.
- Aprecierea corelației existente între nivelurile salivare ale MMP-8, statusul parodontal și modificările histopatologice la pacienții cu parodontită cronică.
- Evaluarea valorii MMP-8 salivare ca biomarker al parodontitei cronice.
- Aplicarea tratamentului parodontal convențional și a unor mijloace generale și locale de tratament imunomodulator.
- Urmărirea evoluției valorilor MMP-8 salivare și a parametrilor clinici sub influența tratamentului.
- Aprecierea comparativă a eficienței metodelor terapeutice aplicate din perspectiva variației indicilor parodontali și a capacității de a inhiba activitatea MMP-8.

### **Metodologie generală**

Studiile clinice au fost efectuate în perioada 2007 – 2011, la Facultatea de Medicină Dentară de la Universitatea de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu”, Cluj-Napoca.

În studiu au fost incluși indivizi sănătoși considerați martori și pacienți cu parodontită cronică pe baza anumitor criterii.

Examenul clinic a presupus înregistrarea parametrilor clinici: indicele parodontal Russel (Periodontal Index - PI), indicele de sângerare gingivală (Gingival Bleeding Index - GBI), adâncimea la sondare (Probing Depth - PD) și nivelul atașamentului gingival (Clinical Attachment Level - CAL).

Probele de salivă au fost recoltate cu ajutorul unor conuri de hârtie absorbantă sterile, calibrate, plasate sublingual.

Specimenele gingivale au fost prelevate în cadrul intervenției de gingivectomie sau al operației cu lambou și au inclus peretele gingival al pungii parodontale și gingia hiperplaziată.

Determinările imunologice constând în măsurarea nivelurilor salivare ale MMP-8 au fost efectuate prin metoda ELISA. Valorile au fost exprimate în ng/ml.

În vederea examenului histopatologic, țesuturile gingivale au fost preparate folosind colorația tricromică Masson modificată de Goldner și au fost studiate la microscopul optic.

Substanțele folosite în tratament au fost: Doxiciclina sub formă de capsule a 10 mg și extractele hidro-alcoolice pe bază de *Echinacea purpurea* și *Sambucus nigra*.

Tratamentele efectuate au fost individualizate astfel: indivizii sănătoși au beneficiat de măsuri de profilaxie, pacienților cu parodontită cronică ușoară și moderată li s-a instituit un tratament convențional parodontal asociat la anumite loturi cu tratamentul imunomodulator costând în administrarea generală per os a Doxiciclinei în doze subantimicrobiene de 20 mg în două prize a câte 10 mg pe zi, și aplicații topice ale soluțiilor pe bază de extracte vegetale sub formă de irigații subgingivale și clătire bucală, timp de o lună.

Analiza statistică a utilizat următoarele metode: testele t-Student pentru eșantioane perechi și independente, analiza de variație ANOVA, testul Post-Hoc cu corecția Bonferroni și coeficientul de corelație Pearson. Pentru prezentarea datelor au fost folosite tabele și graficele de tipul box plot.

### **Studiul 1 : Evaluarea valorii diagnostice a nivelurilor salivare ale MMP-8 la pacienții cu parodontită cronică severă**

Studiul a cuprins pacienți cu parodontită cronică severă (n=11) și indivizi sănătoși considerați martori (n=10).

#### *Rezultatele examenului clinic și ale determinărilor imunologice*

La pacienții parodontopați s-au înregistrat valori semnificativ crescute ale indicilor parodontali și ale MMP-8 salivare prin comparație cu lotul martor ( $p < 0,001$ - Testul t Student pentru eșantioane independente). S-a observat existența unei corelații înalt semnificative statistic între valorile indicilor parodontali și ale nivelurilor MMP-8 salivare ( $r=0,96$ , coeficientul de corelație Pearson).

#### *Rezultatele examenului histopatologic*

La nivelul țesuturilor parodontale s-au decelat : leziuni ale epiteliului gingival sulcular și oral (eroziuni, ulceratii, tendință de proliferare, prezența celulelor imunocompetente) și leziuni ale corionului (infiltrat inflamator cronic, distrucția matricii, alterări ale microcirculației și tendință de fibrozare la distanță de focarul inflamator).

### **Studiul 2 : Aprecierea eficienței tratamentului imunomodulator în parodontita cronică**

Studiul a cuprins pacienți cu parodontită cronică ușoară și moderată (n=30) randomizați în 3 loturi egale care au urmat un tratament diferit, în funcție de lot (lotul 1: tratament parodontal convențional, lotul 2: tratament parodontal convențional asociat cu tratament general cu Doxiciclină 20 mg/zi timp de o lună și lotul 3: tratament parodontal convențional asociat cu aplicații topice de extracte vegetale pe bază de *Echinacea purpurea* și *Sambucus nigra* timp de o lună) și indivizi sănătoși considerați martori (n=10). S-au efectuat trei examinări: înainte de tratament, după o lună (pentru a aprecia efectul tratamentului) și după trei luni (pentru a evalua menținerea în timp a efectului terapeutic).

#### *Rezultatele obținute la prima examinare*

A existat diferență înalt semnificativă statistic între lotul martor și loturile 1, 2 și 3 privind numărul de dinți cu parodontită, valoarea PI și nivelurile salivare ale MMP-8 ( $p < 0,001$ - testul Post Hoc cu corecția Bonferroni). A existat diferență semnificativă statistic între lotul martor și loturile 1, 2 și 3 privind valorile GBI, PD și CAL ( $p < 0,05$ - testul Post Hoc cu corecția Bonferroni).

#### *Rezultatele obținute la a doua examinare*

La loturile 1, 2 și 3 s-a observat o scădere înalt semnificativă statistic a valorilor indicilor parodontali și a nivelurilor MMP-8 salivare după tratament ( $p \leq 0,001$  - testul t Student pentru eșantioane perechi). A existat o diferență semnificativă statistic între diferențele mediilor valorilor indicilor parodontali și ale MMP-8 la cele trei loturi între momentul inițial și după 1 lună. ( $p < 0,05$  - testul ANOVA). La lotul 2 s-a înregistrat o scădere semnificativă statistic privind diferențele mediilor tuturor valorilor indicilor parodontali și ale MMP-8 salivare în comparație cu lotul 1 ( $p \leq 0,001$  - Testul Post Hoc cu corecția Bonferroni). La lotul 3 s-a înregistrat o scădere semnificativă statistic privind diferențele mediilor valorilor GBI, PD, CAL față de lotul 1 ( $p < 0,05$ ); nu a existat diferență semnificativă privind diferențele mediilor valorilor PI și MMP-8 salivare între loturile 1 și 3 ( $p > 0,05$ - Testul Post Hoc cu corecția Bonferroni). La lotul 2 s-a înregistrat o scădere semnificativă statistic privind diferențele mediilor valorilor MMP-8 salivare ( $p < 0,001$ ) prin comparație cu lotul 3; în privința diferențele mediilor parametrilor clinici nu au existat diferențe semnificative ( $p > 0,05$  - Testul Post Hoc cu corecția Bonferroni).

#### *Rezultatele obținute la a treia examinare*

La lotul 1 nu a existat diferență semnificativă statistic privind valorile indicilor parodontali și nivelurile salivare ale MMP-8 între cele două momente ( $p > 0,05$  - testul t Student pentru eșantioane perechi). La lotul 2 nu a existat diferență semnificativă statistic privind nivelurile salivare ale MMP-8 ( $p > 0,05$ ). A existat diferență semnificativă statistic privind valorile PI, PD și CAL ( $p < 0,05$ ) și înalt semnificativă statistic privind valoarea GBI ( $p < 0,001$  - testul t Student pentru

eșantioane perechi). La lotul 3 nu a existat diferență semnificativă statistic privind nivelurile salivare ale MMP-8 ( $p > 0,05$ ). A existat diferență semnificativă statistic privind valorile PI, GBI și CAL ( $p < 0,05$ ) și înalt semnificativă statistic privind valoarea PD ( $p < 0,001$  – testul t Student pentru eșantioane perechi). Nu a existat diferență semnificativă statistic între cele 3 loturi la trei luni după tratament privind valorile indicilor parodontali și a nivelurilor salivare ale MMP-8 ( $p > 0,05$  – testul Post Hoc cu corecția Bonferroni).

### **Studiile experimentale**

#### **Ipoteza de lucru. Obiective**

În parodontologie, utilizarea modelelor animale este deosebit de utilă pentru investigarea mecanismelor imunologice implicate în patogeneza parodontopatiilor și în scopul dezvoltării unor terapii noi. În vederea stabilirii relației cauză-efect și pentru a clarifica rolul MMP-8 în patogeneza parodontitelor, este necesară urmărirea secvențială a instalării patologiei parodontale și evaluarea complexă a modificărilor clinice, histopatologice și imunologice. Dată fiind implicarea MMP-8 în patogeneza parodontopatiilor, ar fi salutară identificarea unor noi preparate vegetale cu efect de inhibare a acestei enzime.

Obiectivele pe care ni le-am propus sunt următoarele:

- Inducerea unei patologii parodontale cronice pe model experimental animal, asemănătoare bolii parodontale umane.
- Urmărirea în dinamică a aspectelor clinice, histopatologice și imunologice pe parcursul instalării afecțiunii.
- Stabilirea corelațiilor dintre severitatea parodontitei apreciată prin modificările clinice și histopatologice și nivelurile serice și salivare ale MMP-8.
- Evaluarea efectului tratamentului de igienizare și a tratamentului imunomodulator general cu Doxiciclină în parodontita cronică indusă experimental.
- Evaluarea efectului imunomodulator al extractelor vegetale pe bază de *Echinacea purpurea*, *Camelia sinensis*, *Filipendula ulmaria* și *Calendula officinalis* și vitamina C în parodontita indusă experimental.

#### **Metodologie generală**

Studiile experimentale s-au efectuat în perioada 2011-2012, la Centrul de Aplicații Practice și Medicină Experimentală al Universității de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu”, Cluj-Napoca.

Studiile experimentale au utilizat 55 șobolani rasa Wistar maturi femele. Patologia parodontală a fost indusă prin însumarea unor leziuni acute ale gingiei, cu intensitate constantă și repetate la intervale regulate timp de 16 zile.

Examenul clinic a fost efectuat zilnic, înregistrându-se gradul de inflamație parodontală și prezența sângerării la sondarea șanțului gingival.

În vederea evaluării modificărilor imunologice au fost recoltate probe de sânge și salivă, iar pentru examenul histopatologic, specimene gingivale. Recoltarea probelor a fost efectuată înainte de inducerea patologiei (Z 1), după 3 zile (Z 3), după 6 zile (Z 6), după 8 zile (Z 8) și după 16 zile (Z 16). În vederea obținerii de specimene histopatologice, 5 dintre animale au fost sacrificate în cele 5 momente menționate. Valorile serice și salivare ale MMP-8 au fost măsurate utilizând o metodă cantitativă enzimatică sandwich ELISA. Valorile au fost exprimate în ng/ml.

Probele de sânge au fost recoltate din sinusul retrorbitar. Probele de salivă au fost recoltate cu ajutorul unor conuri de hârtie absorbantă sterile, calibrate, plasate sublingual.

În vederea examenului histopatologic, țesuturile gingivale au fost preparate folosind colorația tricromică Masson modificată de Goldner și au fost studiate la microscopul optic.

După inducerea patologiei, cele 50 de animale au fost randomizate în 5 loturi egale și li s-au administrat tratamente diferite, în funcție de lot.

Substanțele folosite în tratament au fost : Doxiciclina dizolvată în apa de băut în doză de 1,2 mg/kg corp/zi și geluri mucoadezive conținând extracte pe bază de *Echinacea purpurea*, *Camelia sinensis*, *Filipendula ulmaria* și *Calendula officinalis* și vitamina C.

Tratamentul a durat 12 zile, iar după tratament au fost repetate examinările clinice, histopatologice și imunologice.

Analiza statistică a utilizat următoarele metode : testele t-Student pentru eșantioane perechi și independente, analiza de variație ANOVA, testul Post-Hoc cu corecția Bonferroni și coeficientul de corelație Pearson. Pentru prezentarea datelor au fost folosite tabele și graficele de tipul box plot.

### **Studiul 3: Cercetări privind implicarea MMP-8 în patogeneza parodontitei cronice induse experimental**

Studiul a cuprins 15 șobolani cărora li s-a indus parodontita cronică timp de 16 zile. Instalarea patologiei a fost urmărită clinic și s-au recoltat probe de sânge și salivă în zilele 1, 3, 6, 8 și 16, iar 5 animale au fost sacrificate în aceste cinci momente pentru prelevarea speciemenelor gingivale.

#### *Rezultatele examenelor clinic și histopatologic*

La examenele clinic și histopatologic s-au înregistrat următoarele aspecte: Z 1: aspectul clinic și microscopic al gingiei normale; Z 3: clinic: gingivită incipientă, histopatologic: leziune inițială; Z 6: clinic: gingivită moderată, histopatologic: leziune precoce; Z 8: clinic: gingivită severă, histopatologic: leziune stabilizată; Z 16: clinic: parodontită cronică, histopatologic: leziune avansată.

#### *Rezultatele determinărilor imunologice*

Pe parcursul inducerii patologiei, s-a observat o creștere graduală a nivelurilor serice și salivare ale MMP-8 și existența unei corelații între valorile enzimatică și modificările clinice și histopatologice. Pe parcursul inducerii patologiei parodontale s-a observat existența unei corelații înalt semnificative statistic între valorile serice și salivare ale MMP-8 ( $r=0,92$ , coeficientul de corelație Pearson).

### **Studiul 4: Evaluarea efectului imunomodulator al tratamentului general cu doze subantimicrobiene de Doxiciclină în parodontita cronică indusă experimental**

Studiul a cuprins 20 de șobolani care, după inducerea parodontitei cronice, au fost randomizați în două loturi de studiu și li s-a administrat un tratament diferit: lotul M – tratament de igienizare: îndepărtarea depozitelor moi cu bulete de vată îmbibate în apă oxigenată, lotul D: tratament de igienizare asociat cu Doxiciclină în doze de 1,2 mg/kg corp/zi.

#### *Rezultatele examenelor clinic și histopatologic*

După tratament, clinic și histopatologic s-a remarcat o rezoluție a procesului inflamator gingival la ambele loturi, însă lotul D a avut o evoluție mai favorabilă.

#### *Rezultatele determinărilor imunologice*

S-a înregistrat o scădere semnificativă statistic a valorilor serice și salivare ale MMP-8 la ambele loturi, față de valorile dinainte de tratament ( $p<0,001$ , testul t Student pentru eșantioane perechi). La compararea loturilor s-au observat următoarele aspecte: la lotul D valorile serice au fost semnificativ mai reduse decât la lotul M ( $p<0,001$ ), însă nu au existat diferențe semnificative privind valorile salivare la cele două loturi ( $p>0,05$ , testul Post Hoc cu corecția Bonferroni). S-a observat existența unei corelații înalt semnificative statistic între valorile serice și salivare ale MMP-8 ( $r=0,93$ , coeficientul de corelație Pearson).

### **Studiul 5: Evaluarea tratamentului topic cu extracte vegetale în parodontita cronică indusă experimental**

Studiul a cuprins 40 de șobolani care, după inducerea parodontitei cronice, au fost randomizați în patru loturi de studiu și li s-a administrat un tratament diferit: lotul M a beneficiat de tratament de igienizare, lotul E tratament de igienizare asociat cu aplicații topice ale gelului pe bază de *Echinacea purpurea*, lotul C : tratament de igienizare asociat cu aplicații topice ale gelului pe

bază de *Camelia sinensis* și vit. C, lotul A: tratament de igienizare asociat cu aplicații topice ale gelului pe bază de amestec de plante: *Echinacea purpurea*, *Camelia sinensis*, *Filipendula ulmaria* și *Calendula officinalis*.

#### *Rezultatele examenelor clinic și histopatologic*

După tratament, clinic și histopatologic s-a remarcat o rezoluție a procesului inflamator gingival la toate loturile, dar lotul A a avut evoluția cea mai favorabilă.

#### *Rezultatele determinărilor imunologice*

S-a înregistrat o scădere semnificativă statistic a valorilor serice și salivare ale MMP-8 la toate loturile, față de valorile dinainte de tratament ( $p < 0,001$ , testul t Student pentru eșantioane perechi). La compararea loturilor s-au observat următoarele aspecte: lotul E nu a prezentat diferențe față de lotul M ( $p > 0,05$ , testul Post Hoc cu corecția Bonferroni); la lotul C, valorile salivare au fost semnificativ mai reduse decât la lotul M ( $p < 0,05$ ), însă nu au existat diferențe semnificative privind valorile serice la cele două loturi ( $p > 0,05$ ); la lotul A valorile serice și salivare au fost semnificativ scăzute în comparație cu lotul M ( $p < 0,05$ ). Între loturile E, C și A nu au existat diferențe semnificative statistic privind nivelurile serice și salivare ale MMP-8 ( $p > 0,05$ , testul Post Hoc cu corecția Bonferroni). S-a observat existența unei corelații înalt semnificative statistic între valorile serice și salivare ale MMP-8 ( $r = 0,90$ , coeficientul de corelație Pearson).

### **Concluzii generale**

1. Valorile crescute ale MMP-8 în salivă la pacienții parodontopați în comparație cu martorii sănătoși demonstrează capacitatea enzimei de a semnaliza prezența unui proces inflamator parodontal.
2. Creșterea continuă și graduală a valorilor serice și salivare ale MMP-8 pe parcursul instalării și progresiei parodontitei cronice sugerează implicarea enzimei în patogeneza afecțiunii, prin producerea de leziuni tisulare colaterale.
3. Procesul inflamator parodontal se manifestă local, motiv pentru care cuantificarea valorilor MMP-8 salivare are semnificație diagnostică mai mare comparativ cu nivelurile serice.
4. Valorile salivare ale MMP-8 sunt corelate cu cele serice, astfel că dozarea enzimei în salivă este suficientă pentru aprecierea ecoului parodontitei asupra nivelului inflamației sistemice.
5. Nivelurile salivare crescute ale MMP-8 sunt în relație directă cu gradul de distrucție a țesuturilor gingivale, ceea ce demonstrează abilitatea enzimei de a reflecta severitatea parodontopatiei.
6. Corelarea nivelurilor MMP-8 salivare crescute în parodontita cronică cu valorile indicilor parodontali, conferă dozărilor imunologice valoare diagnostică.
7. Scăderea semnificativă a valorilor salivare și serice ale MMP-8 după tratamentul parodontal demonstrează rolul enzimei în patogeneza parodontitei cronice.
8. Variațiile nivelurilor salivare și serice ale enzimei sunt diferite în funcție de efectele imunomodulatoare ale terapiei instiuite, permițând evaluarea eficienței tratamentului.
9. Tratamentul general cu doze subantimicrobiene de Doxiciclină reduce semnificativ în principal nivelurile serice ale MMP-8 și secundar pe cele salivare.
10. Aplicarea topică a extractelor de *Echinacea purpurea*, *Sambucus nigra*, *Camelia sinensis*, *Filipendula ulmaria* și *Calendula officinalis* reduce nivelurile salivare ale enzimei și favorizează rezoluția procesului inflamator parodontal, demonstrând eficiența tratamentului local în parodontopatii.
11. Eficiența terapiei cu preparate vegetale este în relație directă cu perioada de remanență pe suprafața gingiei, extractele aplicate sub formă de gel mucoadeziv dovedindu-se a fi cele mai indicate.
12. Administrarea topică a extractelor vegetale trebuie luată în considerare ca o modalitate adjuvantă în terapia parodontală, datorită efectului de inhibare a activității MMP-8 și de stimulare a vindecării.



### **Originalitatea și contribuțiile inovatoare ale tezei**

Prin demonstrarea implicării MMP-8 în patogeneza, diagnosticul și tratamentul parodontitei cronice, studiile din cadrul tezei contribuie la dezvoltarea cunoștințelor existente în domeniul implicării factorului imun în boala parodontală.

Metoda de determinare a nivelurilor MMP-8 în salivă folosită în acest studiu se încadrează în mijloacele moderne și inovatoare de diagnostic salivar. De asemenea, metoda a permis elaborarea unui instrument diagnostic obiectiv, facil și neinvaziv în scopul completării informațiilor furnizate de examenul clinic pentru o mai mare precizie a diagnosticului parodontitei cronice.

Modelul experimental original conceput poate constitui o modalitate de reproducere la animalele de experiență a unei patologii asemănătoare parodontitei cronice umane, cu urmărirea evoluției bolii și eficienței tratamentului pe intervale diferite de timp.

Modelul experimental a permis testarea eficienței și siguranței unor mijloace terapeutice inovatoare prin compoziție: extracte din specii de plante care nu au mai fost utilizate în parodontopatii (*Filipendula ulmaria*, *Calendula officinalis*) și prin forma farmaceutică: gel mucoadeziv.

Pe acest model experimental, a fost posibilă testarea efectului tratamentului general cu Doxicilină și topic cu preparatele vegetale nu doar din punctul de vedere al evoluției clinice, ci și al variațiilor enzimatică și al modificărilor histopatologice.

Eficiența și siguranța demonstrate ale extractelor vegetale testate oferă o alternativă tratamentului imunomodulator cu antibiotice, care au acțiune predominant sistemică, în timp ce parodontopatia este o afecțiune locală.

Prin urmare, rezultatele cercetărilor noastre deschid noi perspective spre elaborarea unor scheme terapeutice eficiente, facile și neinvazive care să poată fi aplicate în mod curent și pe scară largă, astfel încât să beneficieze o categorie largă de pacienți parodontopați.

### **Bibliografie selectivă**

1. Dumitriu H. T., Dumitriu S., Dumitriu A. Parodontologie, Ed. Viața Medicală Rom. București, 2009
2. Marsh PD, Devine DA. How is the development of dental biofilms influenced by the host? J Clin Periodontol 2011; 38 (Suppl. 11): 28-35
3. Seymour GJ, Ford PJ, Cullinan MP, Leishman S, Yamazaki K. Relationship between periodontal infections and systemic disease. Clinical Microbiology and Infection. 2007 Oct;13 Suppl 4:3-10.
4. Kinane D. F., Preshaw Ph M. Loos B. G. Host-response: understanding the cellular and molecular mechanisms of host-microbial interactions – Consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. J Clin Periodontol 2011; 38 (Suppl. 11): 44-48
5. Preshaw PM, Taylor JJ. How has research into cytokine interactions and their role in driving immune responses impacted our understanding of periodontitis? J Clin Periodontol 2011; 38 (Suppl. 11): 60-84.
6. Sorsa T, Tjaderhane L, Konttinen YT, Lauhio A, Salo T, Lee HM, Golub LM, Brown DL, Mantyla P. Matrix metalloproteinases: contribution to pathogenesis, diagnosis and treatment of periodontal inflammation. Annals of Medicine. 2006; 38(5):306-21.
7. Nussbaum G, Shapira L: How has neutrophil research improved our understanding of periodontal pathogenesis? Journal of Clinical Periodontology 2011; 38 (Suppl. 11): 49-59.
8. Mariano Sanz and Arie Jan van Winkelhoff Periodontal infections: understanding the complexity – Consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology J Clin Periodontol 2011; 38 (Suppl. 11): 3-6
9. Bianca Boșca, Carmen Mișu, Maria Crișan, Alina Șovrea, Mariana Mărginean, Carmen Melincovici, Anne-Marie Chindriș Aspecte actuale privind rolul factorilor imuni în etiopatogenia

bolii parodontale. Revista de Medicină și Farmacie, vol. 54, supliment3, publicație a Universității de Medicină și Farmacie din Târgu Mureș, University Press, 2008, pg. 63-65

10. Soames J.V., Southam J.C. Oral Pathology, Oxford University Press, 2007
11. Buduneli N, Kinane DF: Host-derived diagnostic markers related to soft tissue destruction and bone degradation in periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* 2011; 38 (Suppl.11): 85–105.
12. Gursoy UK, Könönen E, Pradhan-Palikhe P, Tervahartiala T, Pussinen PJ, Suominen-Taipale L, Sorsa T. Salivary MMP-8, TIMP-1, and ICTP as markers of advanced periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2010 Jun;37(6):487-93.
13. Sexton WM, Lin Y, Kryscio RJ, Dawson DR 3rd, Ebersole JL, Miller CS. Salivary biomarkers of periodontal disease in response to treatment. *J Clin Periodontol.* 2011 May;38(5):434-41.
14. Lee JY, Lee YM, Shin SY, Seol YJ, Ku Y, Rhiu IC, Chung CP, Han SB Effect of subantimicrobial dose doxycycline as an effective adjunct to scaling and root planning. *J Periodontol.* 2004 Nov; 75(11):1500-8.
15. Barnes J, Anderson LA, Gibbons S, Phillipson JD Echinacea species (*Echinacea angustifolia* (DC.) Hell., *Echinacea pallida* (Nutt.) Nutt., *Echinacea purpurea* (L.) Moench): a review of their chemistry, pharmacology and clinical properties. *J Pharm Pharmacol.* 2005 Aug;57(8):929-54
16. Harokopakis E, Albzreh MH, Haase EM, Scannapieco FA, Hajishengallis G Inhibition of proinflammatory activities of major periodontal pathogens by aqueous extracts from elder flower (*Sambucus nigra*). *J Periodontol.* 2006 Feb; 77(2):271-9.
17. Babu Venkateswara, K. Sirisha, Vijay K. Chava Green tea extract for periodontal health, *J Indian Soc Periodontol.* 2011 Jan-Mar; 15(1): 18–22.
18. Bianca Boșca, Carmen Mișu, Maria Crișan, Alina Șovrea, Mariana Mărginean, Carmen Melnicovici, Anne-Marie Chindriș Aspecte histopatologice în boala parodontală: implicarea factorilor imunologici în patogenia distrucțiilor parodontale. *Analele Societății Naționale de Biologie Celulară*, 2007, vol. XII, Editori: A. Ardelean, C. Crăciun Ed. Risoprint, Cluj-Napoca pg. 27-33.
19. Adina Bianca Boșca, V. Miclăuș, C. Rațiu, Carmen Melnicovici Matrix Metalloproteinase-8 – a salivary diagnostic biomarker related to soft tissue destruction in chronic periodontitis. *Annlas of RSCB*, 2012, vol. XVII, pg. 151-157.
20. Krayner JW, Leite RS, Kirkwood KL. Non-surgical chemotherapeutic treatment strategies for the management of periodontal diseases. *Dent Clin North Am.* 2010 Jan;54(1):13-33.
21. Bianca Boșca, Carmen Mișu, Maria Crișan, Alina Șovrea, Mariana Mărginean, Carmen Melnicovici, Anne-Marie Chindriș. Immunomodulatory effect of plant extracts in chronic superficial periodontitis. *Revista medico-chirurgicală a „Societății de Medici și Naturaliști ” din Iași*, 2008, vol. 112, Nr 1, supliment Nr. 1, Iași, pg. 503-506.
22. Górska R, Nedzi-Góra M The effects of the initial treatment phase and of adjunctive low-dose doxycycline therapy on clinical parameters and MMP-8, MMP-9, and TIMP-1 levels in the saliva and peripheral blood of patients with chronic periodontitis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2006 Nov-Dec; 54(6):419-26.
23. Griffin MO, Ceballos G, Villarreal FJ. Tetracycline compounds with non-antimicrobial organ protective properties: possible mechanisms of action. *Pharmacol Res.* 2011 Feb;63(2):102-7. Epub 2010 Oct 14.
24. Sorsa T, Tervahartiala T, Leppilähti J, Hernandez M, Gamonal J, Tuomainen AM, Lauhio A, Pussinen PJ, Mäntylä P. Collagenase-2 (MMP-8) as a point-of-care biomarker in periodontitis and cardiovascular diseases. Therapeutic response to non-antimicrobial properties of tetracyclines. *Pharmacol Res.* 2011 Feb;63(2):108-13. Epub 2010 Oct 16.
25. Oz HS, Puleo DA. Animal models for periodontal disease. *J Biomed Biotechnol.* 2011:754857.

26. Graves DT, Fine D, Teng YT, Van Dyke TE, Hajishengallis G. The use of rodent models to investigate host-bacteria interactions related to periodontal diseases. *J Clin Periodontol.* 2008 Feb;35(2):89-105.
27. Marcaccini AM, Novaes AB Jr, Meschiari CA, Souza SL, Palioto DB, Sorgi CA, Faccioli LH, Tanus-Santos JE, Gerlach RF. Circulating matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) and MMP-9 are increased in chronic periodontal disease and decrease after non-surgical periodontal therapy. *Clin Chim Acta.* 2009 Nov;409(1-2):117-22.
28. Adina Bianca Boşca, V. Miclăuş, H. A. Colosi, Geta Hazi, C. Raţiu, Flavia Ruxandra, V. Rus Evaluation of the immunomodulatory effect of general treatment with sub-antimicrobial doses of Doxycycline in chronic experimental-induced periodontitis. *Annlas of RSCB*, 2012, vol. XVII, pg. 151-157.
29. Parente LM, Lino Júnior Rde S, Tresvenzol LM, Vinaud MC, de Paula JR, Paulo NM. Wound Healing and Anti-Inflammatory Effect in Animal Models of *Calendula officinalis* L. Growing in Brazil. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2012;2012:375671. Epub 2012 Jan 24.
30. Fecka I. Qualitative and quantitative determination of hydrolysable tannins and other polyphenols in herbal products from meadowsweet and dog rose. *Phytochem Anal.* 2009 May;20(3):177-90.

"IULIU HAȚIEGANU" UNIVERSITY OF MEDICINE  
AND PHARMACY CLUJ-NAPOCA

Abstract of the doctoral thesis

**RESEARCHES ON THE ROLE OF IMMUNE FACTORS IN THE  
ETIOLOGY OF PERIODONTAL DISEASE AND THERAPEUTIC POSSIBILITIES**

Scientific Director:

**Prof. Dr. Radu Septimiu Câmpian**

Doctoral candidate:

**Adina Bianca Boșca**

Cluj-Napoca 2012

**CONTENTS**

**ABBREVIATIONS 12**

**INTRODUCTION 13**

**CURRENT STAGE OF KNOWLEDGE 15**

**1. Current data regarding the classification and etiopathogenesis of periodontal disease 17**

1.1. Classification of periodontal disease. Clinical forms 17

1.2. Current concepts in the etiopathogenesis of periodontal disease 18

1.2.1. The microbial determining factor 18

1.2.2. Local favoring factors 18

1.2.3. General favoring factors 19

1.2.4. Pathogenetic mechanisms in periodontal disease 19

1.2.4.1. Direct pathogenetic mechanisms 19

1.2.4.2. Indirect pathogenetic mechanisms 19

**2. Histopathological aspects in periodontal disease 23**

2.1. The histological structure of the marginal periodontium 23

2.2. Development and progression of periodontal disease 27

2.3. Histopathological periodontal changes 27

2.3.1. Changes in the superficial periodontium 27

2.3.2. Changes in the deep periodontium 28

**3. Diagnostic methods and non-surgical therapeutic modalities in various forms of periodontal disease 28**

3.1. Current methods for the diagnosis of periodontal disease 28

3.2. Conventional periodontal treatment 30

3.3. Drug treatment used in periodontal disease 31

3.4. Topical treatment with plant extracts 32

**PERSONAL CONTRIBUTION 33**

**1. Working hypothesis. Objectives 35**

## **2. General methodology 37**

### 2.1. Methodology for clinical studies 37

#### 2.1.1. Target population 37

#### 2.1.2. Methods used 38

##### 2.1.2.1. Clinical periodontal examination 38

##### 2.1.2.2. Biological sampling 39

##### 2.1.2.3. Immunological determinations 40

##### 2.1.2.4. Histopathological examination 41

##### 2.1.2.5. Methods for obtaining the preparations used for treatment 42

##### 2.1.2.6. Treatments performed 43

##### 2.1.2.7. Statistical analysis 44

### 2.2. Methodology for experimental studies 45

#### 2.2.1. Animals used 45

#### 2.2.2. Methods used 45

##### 2.2.2.1. Induction of pathology 45

##### 2.2.2.2. Clinical examination 46

##### 2.2.2.3. Biological sampling 46

##### 2.2.2.4. Immunological determinations 47

##### 2.2.2.5. Histopathological examination 47

##### 2.2.2.6. Methods for obtaining the preparations used for treatment 48

##### 2.2.2.7. Treatments performed 48

##### 2.2.2.8. Statistical analysis 48

## **3. Study 1 – Assessment of the diagnostic value of salivary MMP-8 levels in patients with severe chronic periodontitis 49**

### 3.1. Introduction 49

### 3.2. Working hypothesis. Objectives 50

### 3.3. Material and method 50

### 3.4. Results 51

#### 3.4.1. Results of the clinical examination and immunological determinations 51

#### 3.4.2. Results of the histopathological examination 54

### 3.5. Discussion 62

### 3.6. Conclusions 65

## **4. Study 2 – Evaluation of the effectiveness of immunomodulatory treatment in chronic periodontitis 67**

### 4.1. Introduction 67

### 4.2. Working hypothesis. Objectives 68

### 4.3. Material and method 69

### 4.4. Results 71

#### 4.4.1. Results obtained on the first examination 71

#### 4.4.2. Results obtained on the second examination 72

#### 4.4.3. Results obtained on the third examination 74

### 4.5. Discussion 78

### 4.6. Conclusions 80

## **5. Study 3 – Researches on the implication of MMP-8 in the pathogenesis of experimentally induced chronic periodontitis 81**

### 5.1. Introduction 81

### 5.2. Working hypothesis. Objectives 82

### 5.3. Material and method 82

### 5.4. Results 83

#### 5.4.1. Results of clinical and histopathological examinations 83

|  |            |
|--|------------|
| 5.4.2. Results of immunological determinations   | 89         |
| 5.5. Discussion  | 90         |
| 5.6. Conclusions   | 94         |
| <b>6. Study 4 – Evaluation of the immunomodulatory effect of general treatment with subantimicrobial doxycycline doses in experimentally induced chronic periodontitis</b> | <b>95</b>  |
| 6.1. Introduction  | 95         |
| 6.2. Working hypothesis. Objectives  | 95         |
| 6.3. Material and method   | 96         |
| 6.4. Results   | 97         |
| 6.4.1. Results of clinical and histopathological examinations  | 97         |
| 6.4.2. Results of immunological determinations   | 99         |
| 6.5. Discussion  | 103        |
| 6.6. Conclusions   | 104        |
| <b>7. Study 5 – Evaluation of topical treatment with plant extracts in experimentally induced chronic periodontitis</b>  | <b>105</b> |
| 7.1. Introduction  | 105        |
| 7.2. Working hypothesis. Objectives  | 106        |
| 7.3. Material and method   | 106        |
| 7.4. Results   | 107        |
| 7.4.1. Results of clinical and histopathological examinations  | 107        |
| 7.4.2. Results of immunological determinations   | 112        |
| 7.5. Discussion  | 116        |
| 7.6. Conclusions   | 118        |
| <b>8. General discussion</b>   | <b>119</b> |
| <b>9. General conclusions</b>  | <b>123</b> |
| <b>10. Originality and innovative contributions of the thesis</b>  | <b>125</b> |
| <b>REFERENCES</b>  | <b>127</b> |
| <b>ANNEXES</b>   | <b>137</b> |

**Key words:** periodontal disease, matrix metalloproteinase-8, biomarker, bystander damage, immunomodulatory treatment.

## **INTRODUCTION**

Periodontal disease could be considered a global health problem in terms of quality of life because it does not only affect the dentomaxillary system, but it also influences the general health. This is why the early diagnosis, the effective control and the correct treatment of this disorder are the main goals for periodontologists.

In periodontal disease etiology, the determining role is played by the microbial factor, but immune factors, including endogenous proteolytic enzymes, also have a decisive influence on the development, progression and severity of the disease. Recent studies have demonstrated that matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) is the enzyme with the highest destructive potential on periodontal tissues, being responsible for the production of bystander damage. This is why MMP-8 is considered to be the biomarker of periodontal disease and the main candidate in designing an instrument for objective diagnosis and immunomodulatory therapeutic methods as adjuvants to conventional periodontal treatment. This study aims to continue the existing researches in order to clarify some aspects related to the pathogenetic mechanisms involved in periodontal disease and to assess the diagnostic methods and immunomodulatory therapeutic possibilities in various forms of periodontal disease.

## **PERSONAL CONTRIBUTION**

### **Clinical studies**

#### **Working hypothesis. Objectives**

For chronic periodontitis diagnosis, the measurement of clinical parameters and radiological investigations provide insufficient data, therefore these examinations should be associated with certain immunological determinations to assess the levels of specific biomarkers, such as MMP-8, in oral fluids. Also, a new therapeutic approach is necessary, intended for the inhibition of the activity of MMP-8, the enzyme with the highest collagenolytic effect on periodontal tissues. Certain antibiotics, particularly doxycycline administered by general route in subantimicrobial doses, have an inhibitory effect on MMP-8 activity. Some plant extracts including *Echinacea purpurea* and *Sambucus nigra* extracts have been proposed, which locally delivered might contribute to the reduction of enzymatic activity.

Our proposed objectives are the following:

- To perform clinical, histopathological and immunological investigations in the context of chronic periodontitis.
- To comparatively evaluate the clinical profile and salivary MMP-8 values of chronic periodontitis patients and healthy individuals.
- To assess the correlation between salivary MMP-8 levels, periodontal status and histopathological changes in patients with chronic periodontitis.
- To evaluate the salivary MMP-8 value as a biomarker of chronic periodontitis.
- To apply conventional periodontal treatment, as well as general and local immunomodulatory treatment means.
- To monitor the evolution of salivary MMP-8 values and clinical parameters under the influence of treatment.
- To comparatively assess the effectiveness of the therapeutic methods applied based on the variation of periodontal parameters and on their capacity to inhibit MMP-8 activity.

#### **General methodology**

The clinical studies were performed in the period 2007-2011, at the Faculty of Dental Medicine of the "Iuliu Hațieganu" University of Medicine and Pharmacy Cluj-Napoca.

The study included healthy individuals as controls and chronic periodontitis patients diagnosed on certain criteria.

The clinical examination involved the recording of the clinical parameters: Periodontal Index – PI, Gingival Bleeding Index – GBI, Probing Depth – PD, and Clinical Attachment Level – CAL.

Saliva samples were taken using sterile calibrated absorbent paper cones placed sublingually.

Gingival specimens were taken as part of gingivectomy or flap surgery and included the gingival wall of the periodontal pocket and the hyperplastic gingiva.

Immunological determinations consisting of the measurement of salivary MMP-8 levels were performed using the ELISA method. Values were expressed in ng/ml.

For histopathological examination, gingival tissues were prepared using Masson's trichrome staining modified by Goldner and were studied under the light microscope.

The substances used for treatment were: doxycycline, 10 mg capsules, and hydroalcoholic *Echinacea purpurea* and *Sambucus nigra* extracts.

The treatments performed were individualized as follows: healthy individuals benefited from prophylactic measures, patients with mild and moderate chronic periodontitis received conventional periodontal treatment associated in certain groups with immunomodulatory treatment consisting of the general administration of subantimicrobial doses of doxycycline: 20 mg orally (10 mg twice) daily, and topical applications of plant extract solutions as subgingival irrigation and mouth rinsing for one month.

Statistical analysis used the following methods: Student t tests for paired and independent samples, ANOVA variation analysis, the Post-Hoc test with the Bonferroni correction and Pearson's correlation coefficient. For the presentation of data, tables and Box Plot diagrams were used.

### **Study 1: Assessment of the diagnostic value of salivary MMP-8 values in patients with severe chronic periodontitis**

The study included severe chronic periodontitis patients (n=11) and healthy control individuals (n=10).

#### *Results of clinical examination and immunological determinations*

In periodontitis patients, significantly increased values of periodontal parameters and salivary MMP-8 were found compared to the control group ( $p < 0.001$  – Student t test for independent samples). There was a highly statistically significant correlation between the values of periodontal parameters and MMP-8 salivary values ( $r=0.96$ , Pearson's correlation coefficient).

#### *Results of histopathological examination*

The followings were detected in diseased periodontal tissues: lesions of the oral and sulcular gingival epithelium (erosions, ulcerations, tendency to proliferation, presence of immunocompetent cells) and lesions of the lamina propria (chronic inflammatory infiltrate, destruction of the matrix, alterations of microcirculation and tendency to fibrosis at a distance from the inflammatory site).

### **Study 2: Evaluation of the effectiveness of immunomodulatory treatment in chronic periodontitis**

The study included mild and moderate chronic periodontitis patients (n=30), randomized into 3 equal groups, who underwent different treatments depending on the group (group 1: conventional periodontal treatment, group 2: conventional periodontal treatment associated with general treatment with doxycycline 20 mg/day for one month, and group 3: conventional periodontal treatment associated with topical applications of *Echinacea purpurea* and *Sambucus nigra* extracts for one month), and healthy control individuals (n=10). Three examinations were performed: before treatment, after one month (in order to evaluate the effect of treatment) and after three months (in order to assess the maintenance in time of the therapeutic effect).

#### *Results obtained on the first examination*

There was a highly statistically significant difference between the control group and groups 1, 2 and 3 regarding the number of teeth with periodontitis, the PI value and MMP-8 salivary levels ( $p < 0.001$  – the Post Hoc test with the Bonferroni correction). There was a statistically significant difference between the control group and groups 1, 2 and 3 regarding GBI, PD and CAL values ( $p < 0.05$  – the Post Hoc test with the Bonferroni correction).

#### *Results obtained on the second examination*

In groups 1, 2 and 3 there was a highly statistically significant decrease in the values of periodontal parameters and MMP-8 salivary levels after treatment ( $p \leq 0.001$  - Student t test for paired samples). There was a statistically significant difference between the differences of the means of the values of periodontal parameters and MMP-8 in the three groups between the initial moment and after one month ( $p < 0.05$  – ANOVA test). In group 2, there was a statistically significant decrease regarding the differences of the means of all values of periodontal parameters and salivary MMP-8 compared to group 1 ( $p \leq 0.001$  - the Post Hoc test with the Bonferroni correction). In group 3 there was a statistically significant decrease in the differences of the means of GBI, PD, CAL values compared to group 1 ( $p < 0.05$ ); there was no significant difference in the differences of the means of PI and salivary MMP-8 values between groups 1 and 3 ( $p > 0.05$  – the Post Hoc test with the Bonferroni correction). In group 2, there was a statistically significant decrease in the differences of the means of MMP-8 salivary values ( $p < 0.001$ ) compared to group 3; regarding clinical parameters, there were no significant differences ( $p > 0.05$  – the Post Hoc test with the Bonferroni correction).



### *Results obtained on the third examination*

In group 1, there was no statistically significant difference in the values of periodontal parameters and MMP-8 salivary values between the two moments ( $p > 0.05$  – the Student t test for paired samples). In group 2, there was no statistically significant difference in MMP-8 salivary levels ( $p > 0.05$ ). There was a statistically significant difference in PI, PD and CAL values ( $p < 0.05$ ) and a highly statistically significant difference in the GBI value ( $p < 0.001$ ) – the Student t test for paired samples. In group 3, there was no statistically significant difference in salivary MMP-8 levels ( $p > 0.05$ ). There was a statistically significant difference in PI, GBI and CAL values ( $p < 0.05$ ) and a highly statistically significant difference in the PD value ( $p < 0.001$ ) – the Student t test for paired samples. There was no statistically significant difference between the 3 groups three months after treatment regarding the values of periodontal parameters and MMP-8 salivary levels ( $p > 0.05$  – the Post Hoc test with the Bonferroni correction).

## **Experimental studies**

### **Working hypothesis. Objectives**

In periodontology, the use of animal models is particularly useful for the investigation of immunological mechanisms involved in the pathogenesis of periodontal disease and for the development of new therapies. In order to establish the cause-effect relationship and to clarify the role of MMP-8 in the pathogenesis of periodontitis, the sequential monitoring of the development of periodontal pathology and the complex evaluation of clinical, histopathological and immunological changes are necessary. Given the implication of MMP-8 in the pathogenesis of periodontal disease, the identification of new plant extracts with an inhibitory effect on this enzyme activity would be salutary.

Our proposed objectives are the following:

- To induce chronic periodontal disease in an animal model, similar to human periodontal disease.
- To dynamically monitor clinical, histopathological and immunological aspects during the development of the disorder.
- To establish correlations between the severity of periodontitis evaluated based on clinical and histopathological changes and MMP-8 serum and salivary levels.
- To evaluate the effect of the cleaning treatment and of the general immunomodulatory treatment with doxycycline in experimentally induced chronic periodontitis.
- To assess the immunomodulatory effect of *Echinacea purpurea*, *Camelia sinensis*, *Filipendula ulmaria* and *Calendula officinalis* plant extracts in experimentally induced periodontitis.

### **General methodology**

The experimental studies were performed in the period 2011-2012, at the Practical Applications and Experimental Medicine Center of the "Iuliu Hațieganu" University of Medicine and Pharmacy Cluj-Napoca.

The experimental studies used 55 mature female Wistar rats. Periodontal disease was induced by acute gingival lesions, repeated with a constant intensity at regular time intervals for 16 days.

The clinical examination was performed daily, and the degree of periodontal inflammation and the presence of gingival bleeding on probing were recorded.

For the evaluation of immunological changes, blood and saliva samples were taken and for histopathological examination, gingival specimens were taken. Sampling was performed before the induction of the disease (D1), after 3 days (D3), after 6 days (D6), after 8 days (D8) and after 16 days (D16). In order to obtain histopathological specimens, 5 animals were sacrificed at the 5 mentioned moments. MMP-8 serum and salivary values were measured using a quantitative enzymatic method – sandwich ELISA. Values were expressed in ng/ml.

Blood samples were taken from the retro-orbital sinus. Saliva samples were taken using sterile calibrated absorbent paper cones placed sublingually.

For histopathological examination, gingival tissues were prepared using Masson's trichrome staining modified by Goldner and were studied under the light microscope.

After the disease was induced, the 50 animals were randomized into 5 equal groups and were administered different treatments depending on the group.

The substances used for treatment were: doxycycline dissolved in the drinking water in a dose of 1.2 mg/kg body weight/day and mucoadhesive gels containing *Echinacea purpurea*, *Camelia sinensis*, *Filipendula ulmaria* and *Calendula officinalis* extracts and vitamin C.

Treatment lasted for 12 days, and after treatment clinical, histopathological and immunological examinations were repeated.

Statistical analysis used the following methods: Student t tests for paired and independent samples, ANOVA variation analysis, the Post-Hoc test with the Bonferroni correction and Pearson correlation coefficient. For the presentation of the data, Box Plot tables and diagrams were used.

### **Study 3: Researches on the implication of MMP-8 in the pathogenesis of experimentally induced chronic periodontitis**

The study included 15 rats, in which chronic periodontitis was induced for 16 days. The development of the disease was monitored clinically and blood and saliva samples were taken on days 1, 3, 6, 8 and 16, and 5 animals were killed at these 5 moments in order to take gingival specimens.

#### *Results of clinical and histopathological examinations*

The following aspects were found on clinical and histopathological examinations: D1: the clinical and microscopic aspect of the normal gingiva; D3: clinically: early gingivitis, histopathologically: initial lesion; D6: clinically: moderate gingivitis, histopathologically: early lesion; D8: clinically: severe gingivitis, histopathologically: stable lesion; D16: clinically: chronic periodontitis, histopathologically: advanced lesion.

#### *Results of immunological determinations*

During the induction of the disease, a progressive increase in MMP-8 serum and salivary levels and the presence of a correlation between enzymatic values and clinical and histopathological changes were seen. There was a highly statistically significant correlation between the MMP-8 serum and salivary values ( $r=0.92$ , Pearson's correlation coefficient).

### **Study 4: Evaluation of the immunomodulatory effect of general treatment with subantimicrobial doxycycline doses in experimentally induced chronic periodontitis**

The study included 20 rats that, after the induction of chronic periodontitis, were randomized into two study groups and were administered different treatments: group M – cleaning treatment: removal of soft deposits using cotton pads impregnated with oxygenated water, group D: cleaning treatment associated with doxycycline in doses of 1.2 mg/kg body weight/day.

#### *Results of clinical and histopathological examinations*

After treatment, a clinical and histopathological resolution of the gingival inflammatory process was seen in both groups, but group D had a more favorable evolution.

#### *Results of immunological determinations*

A statistically significant decrease in MMP-8 serum and salivary values was found in both groups compared to values before treatment ( $p<0.001$  - Student t test for paired samples). On the comparison of the groups, the following aspects were found: in group D, MMP-8 serum values were significantly lower than in group M ( $p<0.001$ ), but there were no significant differences in MMP-8 salivary values between the two groups ( $p>0.05$  – the Post Hoc test with the Bonferroni correction). There was a highly statistically significant correlation between the serum and salivary MMP-8 values ( $r=0.93$ , Pearson's correlation coefficient).

### **Study 5: Evaluation of topical treatment with plant extracts in experimentally induced chronic periodontitis**

The study included 40 rats that, after the induction of chronic periodontitis, were randomized into four study groups and were administered different treatments: group M had cleaning treatment, group E had cleaning treatment associated with topical applications of *Echinacea purpurea* gel, group C: cleaning treatment associated with topical applications of *Camelia sinensis* and vitamin C gel, group A: cleaning treatment associated with topical applications of *Echinacea purpurea*, *Camelia sinensis*, *Filipendula ulmaria*, *Calendula officinalis* and vitamin C gel.

#### *Results of clinical and histopathological examinations*

After treatment, a clinical and histopathological resolution of the gingival inflammatory process was seen in all groups, but group A had the most favorable evolution.

#### *Results of immunological determinations*

A statistically significant decrease in serum and salivary MMP-8 values was found in all groups compared to values before treatment ( $p < 0.001$  - Student t test for paired samples). On the comparison of the groups, the following aspects were evidenced: in group E, there were no differences compared to group M ( $p > 0.05$ ); in group C, salivary values were significantly lower than in group M ( $p < 0.05$ ), but there were no significant differences in serum values between the two groups ( $p > 0.05$ ); in group A serum and salivary values were significantly lower compared to group M ( $p < 0.05$ ). Between groups E, C and A there were no statistically significant differences in serum and salivary MMP-8 levels ( $p > 0.05$  - the Post Hoc test with the Bonferroni correction). There was a highly statistically significant correlation between the serum and salivary MMP-8 values ( $r = 0.90$ , Pearson's correlation coefficient).

### **General conclusions**

1. The high salivary MMP-8 values in periodontitis patients compared to healthy controls demonstrate the capacity of the enzyme to signal the presence of an inflammatory periodontal process.
2. The continuous and gradual increase in MMP-8 serum and salivary values during the development and progression of chronic periodontitis suggests the implication of the enzyme in the pathogenesis of this disorder, through collateral tissue lesions.
3. The inflammatory periodontal process manifests locally, which is why the quantification of MMP-8 salivary values has a higher diagnostic significance compared to serum levels.
4. The MMP-8 salivary values are correlated with serum values, so that the measurement of the enzyme in the saliva is sufficient to assess the effect of periodontitis on the level of systemic inflammation.
5. The high MMP-8 salivary levels are directly correlated with the degree of destruction of gingival tissues, which demonstrates the ability of the enzyme to reflect the severity of periodontal disease.
6. The correlation of high MMP-8 salivary levels in chronic periodontitis with the values of periodontal parameters gives immunological measurements diagnostic value.
7. The significant decrease in MMP-8 salivary and serum values after periodontal treatment demonstrates the role of the enzyme in the pathogenesis of chronic periodontitis.
8. The variations of the salivary and serum levels of the enzyme were different depending on the immunomodulatory effects of the initiated therapy and allows for the evaluation of the effectiveness of treatment.
9. General treatment with subantimicrobial doxycycline doses significantly reduces primary MMP-8 serum levels and secondarily, salivary levels.
10. The topical application of *Echinacea purpurea*, *Sambucus nigra*, *Camelia sinensis*, *Filipendula ulmaria* and *Calendula officinalis* extracts reduces MMP-8 salivary levels and favors the

resolution of the inflammatory periodontal process, demonstrating the effectiveness of local treatment in periodontal disease.

11. The effectiveness of plant extracts therapy is directly related to the period during which these remain on the gingival surface, the extracts used as mucoadhesive gels being the most indicated.

12. The topical administration of plant extracts should be considered as an adjuvant modality in periodontal therapy, due to their inhibitory effect on MMP-8 activity and stimulating the healing.

### **Originality and innovative contributions of the thesis**

By demonstrating the implication of MMP-8 in the pathogenesis, diagnosis and treatment of chronic periodontitis, the studies performed as part of the thesis contribute to the development of knowledge regarding the implication of the immune factor in periodontal disease.

The method used in this study for determining MMP-8 salivary levels is a modern and innovative salivary diagnostic method. The method allowed for the development of an objective, easy to use, non-invasive diagnostic instrument in order to supplement the information provided by clinical examination, for a higher accuracy of the diagnosis of chronic periodontitis.

The original experimental model designed can be used to reproduce in experimental animals a disease similar to chronic human periodontitis, with the monitoring of the evolution of the disease and of the effectiveness of treatment during different time periods.

The experimental model allowed for the testing of the effectiveness and safety of therapeutic means that are innovative in terms of composition: extracts from plant species that have not been used before in periodontal disease (*Filipendula ulmaria*, *Calendula officinalis*) and pharmaceutical form: a mucoadhesive gel.

In this experimental model, the testing of the effect of general treatment with doxycycline and topical treatment with plant extracts was possible not only from the point of view of clinical evolution, but also from that of enzymatic variations and histopathological changes.

The demonstrated effectiveness and safety of the tested plant extracts offer an alternative to immunomodulatory treatment with antibiotics, which have a predominantly systemic action, while periodontal disease is a local disorder.

Consequently, the results of our researches open new perspectives towards the development of effective, easy to use, non-invasive therapeutic schemes to be used on a wide scale, for the benefit of a large category of periodontitis patients.

L'UNIVERSITÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE  
« IULIU HAȚIEGANU » CLUJ-NAPOCA

Résumé de la thèse de doctorat

**RECHERCHES SUR LE RÔLE DES FACTEURS IMMUNS  
DANS L'ÉTIOLOGIE DE LA MALADIE PARODONTALE  
ET LES POSSIBILITÉS THÉRAPEUTIQUES**

Directeur scientifique:  
Prof. Dr. **Radu Septimiu Câmpian**

Doctorant:  
**Adina Bianca Boșca**

Cluj-Napoca 2012

**TABLE DES MATIÈRES**

**ABBREVIATIONS 12**

**INTRODUCTION 13**

**LE STADE ACTUEL DE LA CONNAISSANCE 15**

**1. Les données actuelles sur la classification et l'étiopathogénèse de la maladie parodontale 17**

1.1. La classification de la maladie parodontale. Les formes cliniques 17

1.2. Les concepts actuels dans l'étiopathogénèse de la maladie parodontale 18

1.2.1. Le facteur déterminant microbien 18

1.2.2. Les facteurs favorisants locaux 18

1.2.3. Les facteurs favorisants généraux 19

1.2.4. Les mécanismes pathogénétiques dans la maladie parodontale 19

1.2.4.1. Les mécanismes pathogénétiques directs 19

1.2.4.2. Les mécanismes pathogénétiques indirects 19

**2. Les aspects histopathologiques dans la maladie parodontale 23**

2.1. La structure histologique du parodonte marginal 23

2.2. L'installation et le progrès de la maladie parodontale 27

2.3. Les changements histopathologiques parodontaux 27

2.3.1. Les changements au niveau du parodonte superficiel 27

2.3.2. Les changements au niveau du parodonte profond 28

**3. Les moyens de diagnostic et les modalités thérapeutiques non-chirurgicales dans différentes formes de maladie parodontale 28**

3.1. Les moyens actuels pour le diagnostic de la maladie parodontale 28

3.2. Le traitement parodontal conventionnel 30

3.3. Le traitement médicamenteux utilisé dans les parodontopathies 31

3.4. Le traitement topique par des extraits de plantes 32

## **LA CONTRIBUTION PERSONNELLE 33**

**1. L'hypothèse de travail. Les objectifs 35**

**2. La méthodologie générale 37**

2.1. La méthodologie pour les études cliniques 37

2.1.1. La population cible 37

2.1.2. Les méthodes utilisées 38

2.1.2.1. L'examen clinique parodontal 38

2.1.2.2. Le prélèvement des échantillons biologiques 39

2.1.2.3. Les déterminations immunologiques 40

2.1.2.4. L'examen histopathologique 41

2.1.2.5. Les méthodes d'obtention des préparations utilisées dans le traitement 42

2.1.2.6. Les traitements effectués 43

2.1.2.7. L'analyse statistique 44

2.2. La méthodologie pour les études expérimentales 45

2.2.1. Les animaux utilisés 45

2.2.2. Les méthodes utilisées 45

2.2.2.1. L'induction de la pathologie 45

2.2.2.2. L'examen clinique 46

2.2.2.3. Le prélèvement des échantillons biologiques 46

2.2.2.4. Les déterminations immunologiques 47

2.2.2.5. L'examen histopathologique 47

2.2.2.6. Les méthodes d'obtention des préparations utilisées dans le traitement 48

2.2.2.7. Les traitements effectués 48

2.2.2.8. L'analyse statistique 48

**3. Étude 1 – L'évaluation de la valeur diagnostique des niveaux de MMP-8 salivaire chez les patients atteints de parodontite chronique sévère 49**

3.1. Introduction 49

3.2. Hypothèse de travail. Objectifs 50

3.3. Matériel et méthode 50

3.4. Résultats 51

3.4.1. Résultats de l'examen clinique et des déterminations immunologiques 51

3.4.2. Résultats de l'examen histopathologique 54

3.5. Discussion 62

3.6. Conclusions 65

**4. Étude 2 – L'appréciation de l'efficacité du traitement immunomodulateur dans la parodontite chronique 67**

4.1. Introduction 67

4.2. Hypothèse de travail. Objectifs 68

4.3. Matériel et méthode 69

4.4. Résultats 71

4.4.1. Résultats obtenus au premier examen 71

4.4.2. Résultats obtenus au deuxième examen 72

4.4.3. Résultats obtenus au troisième examen 74

4.5. Discussion 78

4.6. Conclusions 80

**5. Étude 3 – Recherches sur l'implication de la MMP-8 dans la pathogenèse de la parodontite chronique induite expérimentalement 81**

5.1. Introduction 81

5.2. Hypothèse de travail. Objectifs 82

|   |            |
|---|------------|
| 5.3. Matériel et méthode  | 82         |
| 5.4. Résultats  | 83         |
| 5.4.1. Résultats des examens clinique et histopathologique  | 83         |
| 5.4.2. Résultats des déterminations immunologiques  | 89         |
| 5.5. Discussion   | 90         |
| 5.6. Conclusions  | 94         |
| <b>6. Étude 4 – L'évaluation de l'effet immunomodulateur du traitement général à doses subantimicrobiennes de doxycycline dans la parodontite chronique induite expérimentalement</b> | <b>95</b>  |
| 6.1. Introduction   | 95         |
| 6.2. Hypothèse de travail. Objectifs  | 95         |
| 6.3. Matériel et méthode  | 96         |
| 6.4. Résultats  | 97         |
| 6.4.1. Résultats des examens clinique et histopathologique  | 97         |
| 6.4.2. Résultats des déterminations immunologiques  | 99         |
| 6.5. Discussion   | 103        |
| 6.6. Conclusions  | 104        |
| <b>7. Étude 5 – L'évaluation du traitement topique par extraits de plantes dans la parodontite chronique induite expérimentalement</b>  | <b>105</b> |
| 7.1. Introduction   | 105        |
| 7.2. Hypothèse de travail. Objectifs  | 106        |
| 7.3. Matériel et méthode  | 106        |
| 7.4. Résultats  | 107        |
| 7.4.1. Résultats des examens clinique et histopathologique  | 107        |
| 7.4.2. Résultats des déterminations immunologiques  | 112        |
| 7.5. Discussion   | 116        |
| 7.6. Conclusions  | 118        |
| <b>8. Discussion générale</b>   | <b>119</b> |
| <b>9. Conclusions générales</b>   | <b>123</b> |
| <b>10. L'originalité et les contributions innovatrices de la thèse</b>  | <b>125</b> |
| <b>RÉFÉRENCES</b>   | <b>27</b>  |
| <b>ANNEXES</b>  | <b>137</b> |

**Mots clés:** maladie parodontale, métalloprotéinase matricielle-8, marqueur biologique, lésions tissulaires collatérales, traitement immunomodulateur.

## **INTRODUCTION**

La maladie parodontale pourrait être considérée comme un problème global de santé du point de vue de la qualité de la vie car elle affecte non seulement l'appareil dento-maxillaire, mais influence l'état de santé de l'organisme entier. C'est pourquoi le diagnostic précoce, le contrôle efficace et le traitement correct de la maladie représentent le but principal des médecins parodontologues.

Dans l'étiologie des parodontopathies, le rôle déterminant revient au facteur microbien, mais les facteurs immuns, dont les enzymes protéolytiques endogènes, ont une influence décisive dans l'installation, le progrès et la sévérité de la maladie. Des recherches récentes ont démontré que la métalloprotéinase matricielle-8 (MMP-8) est l'enzyme ayant le plus haut potentiel destructif sur les tissus parodontaux, étant responsable de la production de lésions tissulaires collatérales. C'est pourquoi la MMP-8 a été désignée le biomarqueur de la maladie parodontale et le candidat principal en vue de concevoir un instrument pour le diagnostic objectif et des moyens thérapeutiques immunomodulateurs, adjuvants au traitement parodontal conventionnel. Cette

étude vise à continuer les recherches pour clarifier certains aspects liés aux mécanismes pathogénétiques impliqués dans la maladie parodontale et pour évaluer les modalités de diagnostic et les possibilités thérapeutiques immunomodulatrices dans diverses formes d'atteinte du parodonte.

## **LA CONTRIBUTION PERSONNELLE**

### **Les études cliniques**

#### **Hypothèse de travail. Objectifs**

Dans le diagnostic de la parodontite chronique, la mesure des paramètres cliniques et les investigations radiologiques ne fournissent pas des données suffisantes, raison pour laquelle ces examens doivent être complétés par certaines déterminations immunologiques pour quantifier le niveau de marqueurs biologiques tels que la MMP-8 dans les fluides oraux. Une nouvelle approche thérapeutique adressée à l'inhibition de l'activité de la MMP-8, l'enzyme ayant l'effet collagénolytique le plus intense sur les tissus parodontaux, est également nécessaire. Certains antibiotiques, particulièrement la doxycycline administrée par voie générale à doses subantimicrobiennes, ont un effet d'inhibition de l'activité de la MMP-8. On a proposé également certains extraits de plantes, dont ceux à base d'*Echinacea purpurea* et *Sambucus nigra* qui, appliqués localement, contribueraient à la réduction de l'activité enzymatique.

Nous nous sommes proposé les objectifs suivants:

- Effectuer des investigations cliniques, histopathologiques et immunologiques dans le contexte de la parodontite chronique.
- Évaluer comparativement le profil clinique et les valeurs de MMP-8 salivaire chez les patients parodontopathiques et chez les individus sains.
- Apprécier la corrélation existante entre les niveaux de MMP-8 salivaire, le statut parodontal et les changements histopathologiques chez les patients atteints de parodontite chronique.
- Évaluer la valeur de la MMP-8 salivaire en tant que marqueur biologique de la parodontite chronique.
- Appliquer le traitement parodontal conventionnel et des moyens généraux et locaux de traitement immunomodulateur.
- Suivre l'évolution des valeurs de MMP-8 salivaire et des paramètres cliniques sous l'influence du traitement.
- Apprécier comparativement l'efficacité des méthodes thérapeutiques appliquées sur la base des indices parodontaux et de leur capacité d'inhiber l'activité de la MMP-8.

#### **La méthodologie générale**

Les études cliniques ont été réalisées dans la période 2007-2011, à la Faculté de Médecine Dentaire de l'Université de Médecine et de Pharmacie « Iuliu Hațieganu » Cluj-Napoca.

L'étude a inclus des individus sains considérés comme témoins et des patients atteints de parodontite chronique sur la base de certains critères.

L'examen clinique a supposé l'enregistrement des paramètres cliniques: l'Indice Parodontal (IP), l'Indice de Saignement Gingival (ISG), la Profondeur de Sondage (PS) et le Niveau d'Attache Clinique (NAC).

Les échantillons de salive ont été prélevés à l'aide de cônes de papier absorbant stériles, calibrés, placés sublingualement.

Les spécimens gingivaux ont été prélevés dans le cadre de l'intervention de gingivectomie ou de l'intervention à lambeau et ont inclus la paroi gingivale de la poche parodontale et la gencive hyperplasiée.

Les déterminations immunologiques consistant dans la mesure des niveaux de MMP-8 salivaire ont été effectuées par la méthode ELISA. Les valeurs ont été exprimées en ng/ml.



En vue de l'examen histopathologique, les tissus gingivaux ont été préparés en utilisant la coloration trichrome de Masson modifié par Goldner et ont été étudiés au microscope optique.

Les substances utilisées pour le traitement ont été: la doxycycline sous forme de capsules de 10 mg et les extraits hydro-alcooliques à base d'*Echinacea purpurea* et *Sambucus nigra*.

Les traitements effectués ont été individualisés de la manière suivante: les individus sains ont bénéficié de mesures de prophylaxie, les patients atteints de parodontite chronique légère ou modérée ont reçu un traitement parodontal conventionnel associé dans certains groupes au traitement immunomodulateur consistant dans l'administration générale de la doxycycline à doses subantimicrobiennes de 20 mg en deux prises de 10 mg par jour, et des applications topiques de solutions à base d'extraits de plantes sous forme d'irrigations sous-gingivales et de rinçage buccal, pendant un mois.

L'analyse statistique a utilisé les méthodes suivantes: les tests de Student t pour des échantillons appariés et indépendants, l'analyse de variance ANOVA, le test Post-Hoc avec la correction de Bonferroni et le coefficient de corrélation de Pearson. Pour présenter les données, on a utilisé des tableaux et des diagrammes de type box-plot.

### **Étude 1: L'évaluation de la valeur diagnostique des niveaux de MMP-8 salivaire chez les patients atteints de parodontite chronique sévère**

L'étude a inclus des patients atteints de parodontite chronique sévère (n=11) et des individus sains considérés comme témoins (n=10).

#### *Résultats de l'examen clinique et des déterminations immunologiques*

Chez les patients parodontopathiques, on a enregistré des valeurs significativement élevées des indices parodontaux et de la MMP-8 salivaire par rapport au groupe de contrôle ( $p < 0,001$  - le test t pour des échantillons indépendants). On a observé la présence d'une corrélation hautement significative statistiquement entre les valeurs des indices parodontaux et les niveaux de MMP-8 salivaire ( $r=0,96$ , le coefficient de corrélation de Pearson).

#### *Résultats de l'examen histopathologique*

Au niveau des tissus parodontaux on a décelé: des lésions de l'épithélium sulculaire et gingival (érosions, ulcérations, tendance à la prolifération, présence des cellules immunocompétentes) et des lésions du chorion (infiltrat inflammatoire chronique, destruction de la matrice, altérations de la microcirculation et tendance à la fibrose à distance du foyer inflammatoire).

### **Étude 2: L'appréciation de l'efficacité du traitement immunomodulateur dans la parodontite chronique**

L'étude a inclus des patients atteints de parodontite chronique légère et modérée (n=30), randomisés dans 3 groupes égaux, qui ont suivi des traitements différents en fonction du groupe (groupe 1: traitement parodontal conventionnel, groupe 2: traitement parodontal conventionnel associé au traitement général par doxycycline 20 mg/jour pendant un mois et groupe 3: traitement parodontal conventionnel associé aux applications topiques d'extraits de plantes à base d'*Echinacea purpurea* et *Sambucus nigra* pendant un mois) et des individus sains de contrôle (n=10). On a effectué trois examens: avant le traitement, après un mois (pour apprécier l'effet du traitement) et après trois mois (pour évaluer le maintien dans le temps de l'effet thérapeutique).

#### *Résultats obtenus au premier examen*

Il y a eu une différence hautement significative statistiquement entre le groupe de contrôle et les groupes 1, 2 et 3 en ce qui concerne le nombre de dents avec parodontite, la valeur de l'IP et les niveaux de MMP-8 salivaire ( $p < 0,001$  - le test Post Hoc avec la correction de Bonferroni). Il y a eu une différence statistiquement significative entre le groupe de contrôle et les groupes 1, 2 et 3 concernant les valeurs de l'ISG, de la PS et du NAC ( $p < 0,05$  - le test Post Hoc avec la correction de Bonferroni).

#### *Résultats obtenus au deuxième examen*

Dans les groupes 1, 2 et 3 on a remarqué une diminution hautement significative statistiquement des valeurs des indices parodontaux et des niveaux de MMP-8 salivaire après le

traitement ( $p \leq 0,001$  – le test de Student t pour des échantillons appariés). Il y a eu une différence statistiquement significative entre les différences des moyennes des valeurs des indices parodontaux et de la MMP-8 dans les trois groupes entre le moment initial et après 1 mois ( $p < 0,05$  – le test ANOVA). Dans le groupe 2 on a enregistré une diminution statistiquement significative de toutes les valeurs des différences des moyennes des indices parodontaux et de la MMP-8 salivaire en comparaison du groupe 1 ( $p \leq 0,001$  – le test Post Hoc avec la correction de Bonferroni). Dans le groupe 3 il y a eu une diminution statistiquement significative des différences des moyennes des valeurs de l'ISG, de la PS, du NAC en comparaison du groupe 1 ( $p < 0,05$ ); il n'y a pas eu de différence significative des différences des moyennes des valeurs des IP et de la MMP-8 salivaire entre les groupes 1 et 3 ( $p > 0,05$  – le test Post Hoc avec la correction de Bonferroni). Dans le groupe 2 on a enregistré une réduction statistiquement significative des différences des moyennes des valeurs de MMP-8 salivaire ( $p < 0,001$ ) par rapport au groupe 3; en ce qui concerne les paramètres cliniques, il n'y a pas eu de différences significatives ( $p > 0,05$  – le test Post Hoc avec la correction de Bonferroni).

#### *Résultats obtenus au troisième examen*

Dans le groupe 1, il n'y a pas eu de différence statistiquement significative concernant les valeurs des indices parodontaux et les niveaux de MMP-8 salivaire entre les deux moments ( $p > 0,05$  – le test de Student t pour des échantillons appariés). Dans le groupe 2, il n'y a pas eu de différence statistiquement significative des niveaux de MMP-8 salivaire ( $p > 0,05$ ). Il y a eu une différence statistiquement significative des valeurs de l'IP, de la PS et du NAC ( $p < 0,05$ ) et une différence hautement significative statistiquement concernant la valeur de l'ISG ( $p < 0,001$ ) – le test de Student t pour des échantillons appariés. Dans le groupe 3 il n'y a pas eu de différence statistiquement significative en ce qui concerne les niveaux de MMP-8 salivaire ( $p > 0,05$ ). Il y a eu une différence statistiquement significative des valeurs de l'IP, de l'ISG et du NAC ( $p < 0,05$ ) et une différence hautement significative statistiquement en ce qui concerne la valeur de la PS ( $p < 0,001$ ) – le test de Student t pour des échantillons appariés. Il n'y a pas eu de différence statistiquement significative entre les 3 groupes trois mois après le traitement en ce qui concerne les valeurs des indices parodontaux et les niveaux de MMP-8 salivaire ( $p > 0,05$  – le test Post Hoc avec la correction de Bonferroni).

## **Les études expérimentales**

### **Hypothèse de travail. Objectifs**

En parodontologie, l'utilisation des modèles animaux est particulièrement utile pour l'investigation des mécanismes immunologiques dans la pathogenèse des parodontopathies et pour le développement de nouvelles thérapies. Afin d'établir la relation cause-effet et pour clarifier le rôle de la MMP-8 dans la pathogenèse des parodontites, il est nécessaire de suivre séquentiellement l'installation de la pathologie parodontale et l'évaluation complexe des changements cliniques, histopathologiques et immunologiques. Étant donné l'implication de la MMP-8 dans la pathogenèse des parodontopathies, l'identification de nouvelles préparations de plantes ayant un effet d'inhibition sur cette enzyme serait salutaire.

Nous nous sommes proposé les objectifs suivants:

- Induire une pathologie parodontale chronique dans un modèle expérimental animal, similaire à la maladie parodontale humaine.
- Suivre en dynamique les aspects cliniques, histopathologiques et immunologiques au cours de l'installation de la maladie.
- Établir des corrélations entre la sévérité de la parodontite évaluée par les changements cliniques et histopathologiques et les niveaux de MMP-8 sérique et salivaire.
- Évaluer l'effet du traitement d'hygiénisation et du traitement immunomodulateur général par doxycycline dans la parodontite chronique induite expérimentalement.

- Évaluer l'effet immunomodulateur des extraits de plantes à base d'*Echinacea purpurea*, *Camelia sinensis*, *Filipendula ulmaria* et *Calendula officinalis* dans la parodontite induite expérimentalement.

### **La méthodologie générale**

Les études expérimentales ont été réalisées dans la période 2011-2012, au Centre d'Applications Pratiques et de Médecine Expérimentale de l'Université de Médecine et de Pharmacie « Iuliu Hațieganu » Cluj-Napoca.

Les études expérimentales ont utilisé 55 rats Wistar adultes femelles. La pathologie parodontale a été induite par des lésions aiguës de la gencive, répétées avec une intensité constante à des intervalles de temps réguliers de 16 jours.

On a effectué un examen clinique chaque jour et on a enregistré le degré d'inflammation parodontale et la présence du saignement lors du sondage du sillon gingival.

Afin d'évaluer les changements immunologiques, on a prélevé des échantillons de sang et de salive et pour l'examen histopathologique, des spécimens gingivaux. Les échantillons ont été prélevés avant l'induction de la pathologie (J1), après 3 jours (J3), après 6 jours (J6), après 8 jours (J8) et après 16 jours (J16). En vue d'obtenir des spécimens histopathologiques, 5 animaux ont été sacrifiés aux 5 moments mentionnés. Les valeurs de MMP-8 sérique et salivaire ont été mesurées en utilisant une méthode quantitative enzymatique, sandwich ELISA. Les valeurs ont été exprimées en ng/ml.

On a prélevé les échantillons de sang au sinus rétro-orbitaire. Les échantillons de salive ont été prélevés à l'aide de cônes de papier absorbant stériles, calibrés, placés sublingualement.

En vue de l'examen histopathologique, les tissus gingivaux ont été préparés en utilisant la coloration trichrome de Masson modifié par Goldner et ont été étudiés au microscope optique.

Après l'induction de la pathologie, on a randomisé les 50 animaux dans des groupes égaux et on leur a administré des traitements différents en fonction du groupe.

Les substances utilisées pour le traitement ont été: la doxycycline dissolue dans l'eau à boire à une dose de 1,2 mg/kg poids corporel/jour et des gels mucoadhésifs contenant des extraits à base d'*Echinacea purpurea*, *Camelia sinensis*, *Filipendula ulmaria*, *Calendula officinalis* et vitamine C.

Le traitement a duré 12 jours et après le traitement on a répété les examens cliniques, histopathologiques et immunologiques.

L'analyse statistique a utilisé les méthodes suivantes: les tests de Student t pour des échantillons appariés et indépendants, l'analyse de variance ANOVA, le test Post-Hoc avec la correction de Bonferroni et le coefficient de corrélation de Pearson. Pour présenter les données, on a utilisé des tableaux et des diagrammes de type box-plot.

### **Étude 3: Recherches sur l'implication de la MMP-8 dans la pathogenèse de la parodontite chronique induite expérimentalement**

L'étude a inclus 15 rats auxquels on a induit la parodontite chronique pendant 16 jours. L'installation de la pathologie a été suivie cliniquement et on a prélevé des échantillons de sang et de salive aux jours 1, 3, 6, 8 et 16, et 15 animaux ont été sacrifiés aux cinq moments pour le prélèvement des spécimens gingivaux.

#### *Résultats des examens clinique et histopathologique*

Lors des examens clinique et histopathologique on a enregistré les aspects suivants: J1: l'aspect clinique et microscopique de la gencive normale; J3: cliniquement: gingivite naissante, histopathologiquement: lésion initiale; J6: cliniquement: gingivite modérée, histopathologiquement: lésion précoce; J8: cliniquement: gingivite sévère, histopathologiquement: lésion stabilisée; J16: cliniquement: parodontite chronique, histopathologiquement: lésion avancée.

#### *Résultats des déterminations immunologiques*

Pendant l'induction de la pathologie, on a observé une augmentation graduelle des niveaux de MMP-8 sérique et salivaire et l'existence d'une corrélation entre les valeurs enzymatiques et les changements cliniques et histopathologiques. On a observé la présence d'une corrélation

hautement significative statistiquement entre les valeurs des niveaux sériques et salivaires de MMP-8 ( $r=0,92$ , le coefficient de corrélation de Pearson).

#### **Étude 4: L'évaluation de l'effet immunomodulateur du traitement général à doses subantimicrobiennes de doxycycline dans la parodontite chronique induite expérimentalement**

L'étude a inclus 20 rats qui, après l'induction de la parodontite chronique, ont été randomisés dans deux groupes d'étude et ont reçu des traitements différents: le groupe M - traitement d'hygiénisation: élimination des dépôts mous par des tampons de coton imbibés d'eau oxygénée, groupe D: traitement d'hygiénisation associé à la doxycycline à doses de 1,2 mg/kg poids corporel/jour.

##### *Résultats des examens clinique et histopathologique*

Après le traitement, on a remarqué cliniquement et histopathologiquement une résolution du processus inflammatoire gingival dans les deux groupes, mais le groupe D a eu une évolution plus favorable.

##### *Résultats des déterminations immunologiques*

On a enregistré une réduction statistiquement significative des valeurs de MMP-8 sérique et salivaire dans les deux groupes par rapport aux valeurs avant le traitement ( $p<0,001$  – le test de Student t pour des échantillons appariés). Lors de la comparaison des groupes on a observé les aspects suivants: dans le groupe D les valeurs de MMP-8 sérique ont été significativement plus réduites que dans le groupe M ( $p<0,001$ ), mais il n'y a pas eu de différences significatives des valeurs de MMP-8 salivaire entre les deux groupes ( $p>0,05$  – le test Post Hoc avec la correction de Bonferroni). On a observé la présence d'une corrélation hautement significative statistiquement entre les valeurs des niveaux sériques et salivaires de MMP-8 ( $r=0,93$ , le coefficient de corrélation de Pearson).

#### **Étude 5: L'évaluation du traitement topique par extraits de plantes dans la parodontite chronique induite expérimentalement**

L'étude a inclus 40 rats qui, après l'induction de la parodontite chronique, ont été randomisés dans quatre groupes d'étude et ont reçu des traitements différents: le groupe M a bénéficié d'un traitement d'hygiénisation, le groupe E a reçu un traitement d'hygiénisation associé à des applications topiques du gel à base d'*Echinacea purpurea*, le groupe C: traitement d'hygiénisation associé à des applications topiques du gel à base de *Camelia sinensis* et vitamine C, le groupe A: traitement d'hygiénisation associé à des applications topiques du gel à base d'*Echinacea purpurea*, *Camelia sinensis*, *Filipendula ulmaria* et *Calendula officinalis* et vitamine C.

##### *Résultats des examens clinique et histopathologique*

Après le traitement, on a remarqué cliniquement et histopathologiquement une résolution du processus inflammatoire gingival dans tous les groupes, mais le groupe A a eu l'évolution la plus favorable.

##### *Résultats des déterminations immunologiques*

On a enregistré une réduction statistiquement significative des valeurs de MMP-8 sérique et salivaire dans tous les groupes par rapport aux valeurs avant le traitement ( $p<0,001$  – le test de Student t pour des échantillons appariés). Lors de la comparaison des groupes, on a observé les aspects suivants: dans le groupe E il n'y a pas eu de différences par rapport au groupe M ( $p>0,05$ ); dans le groupe C, les valeurs de MMP-8 salivaire ont été significativement plus réduites que dans le groupe M ( $p<0,05$ ), mais il n'y a pas eu de différences significatives des valeurs de MMP-8 sérique entre les deux groupes ( $p>0,05$ ); dans le groupe A les valeurs de MMP-8 sérique et salivaire ont été significativement réduites en comparaison du groupe M ( $p<0,05$ ). Entre les groupes E, C et A il n'y a pas eu de différences statistiquement significatives des niveaux de MMP-8 sérique et salivaire ( $p>0,05$  – le test Post Hoc avec la correction de Bonferroni). On a observé la présence d'une corrélation hautement significative statistiquement entre les valeurs des niveaux sériques et salivaires de MMP-8 ( $r=0,90$ , le coefficient de corrélation de Pearson).

### **Conclusions générales**

1. Les valeurs élevées de MMP-8 salivaire chez les patients parodontopathiques en comparaison des témoins sains démontrent la capacité de l'enzyme de signaler la présence d'un processus inflammatoire parodontal.

2. L'augmentation continue et graduelle des valeurs de MMP-8 sérique et salivaire au cours de l'installation et du progrès de la parodontite chronique suggère l'implication de l'enzyme dans la pathogenèse de la maladie, par des lésions tissulaires collatérales.

3. Le processus inflammatoire parodontal se manifeste localement, raison pour laquelle la quantification des valeurs de MMP-8 salivaire a une signification diagnostique supérieure comparativement aux niveaux de MMP-8 sérique.

4. Les valeurs de MMP-8 salivaire sont corrélées avec les valeurs de MMP-8 sérique, de sorte que la détermination de l'enzyme dans la salive est suffisante pour apprécier l'effet de la parodontite sur le niveau de l'inflammation systémique.

5. Les niveaux élevés de MMP-8 salivaire sont en relation directe avec le degré de destruction des tissus gingivaux, ce qui prouve la capacité de l'enzyme de refléter la sévérité de la parodontopathie.

6. La corrélation des niveaux élevés de MMP-8 salivaire dans la parodontite chronique avec les valeurs des indices parodontaux confère aux déterminations immunologiques une valeur diagnostique.

7. La réduction significative des valeurs de MMP-8 salivaire et sérique après le traitement parodontal prouve le rôle de l'enzyme dans la pathogenèse de la parodontite chronique.

8. Les variations des niveaux de MMP-8 salivaire et sérique ont été différentes en fonction des effets immunomodulateurs de la thérapie initiée, permettant l'évaluation de l'efficacité du traitement.

9. Le traitement général à doses subantimicrobiennes de doxycycline réduit significativement les niveaux de MMP-8 sérique en premier lieu, et secondairement les niveaux de MMP-8 salivaire.

10. L'application topique des extraits d'*Echinacea purpurea*, *Sambucus nigra*, *Camelia sinensis*, *Filipendula ulmaria* et *Calendula officinalis* réduit les niveaux de l'enzyme dans la salive et favorise la résolution du processus inflammatoire parodontal, démontrant l'efficacité du traitement local dans les parodontopathies.

11. L'efficacité de la thérapie par extraits de plantes est en relation directe avec la période de leur rémanence sur la surface de la gencive, les extraits appliqués sous forme de gel mucoadhésif s'avérant les plus indiqués.

12. L'administration topique des extraits de plantes doit être prise en considération comme une modalité adjuvante dans la thérapie parodontale, grâce à son effet d'inhibition de l'activité de la MMP-8 et de stimulation de la guérison.

### **L'originalité et les contributions innovatrices de la thèse**

En démontrant l'implication de la MMP-8 dans la pathogenèse, le diagnostic et le traitement de la parodontite chronique, les études réalisées dans le cadre de la thèse contribuent au développement des connaissances existantes dans le domaine de l'implication du facteur immunitaire dans la maladie parodontale.

La méthode pour la détermination des niveaux de MMP-8 dans la salive utilisée dans cette étude s'inscrit dans les moyens modernes et innovateurs de diagnostic salivaire. La méthode a permis l'élaboration d'un instrument diagnostique objectif, facile et non-invasif afin de compléter les informations fournies par l'examen clinique pour une plus grande précision du diagnostic de la parodontite chronique.

Le modèle expérimental original conçu peut constituer une modalité de reproduire chez les animaux d'expérience une pathologie similaire à la parodontite chronique humaine, en suivant l'évolution de la maladie et l'efficacité du traitement pendant différents intervalles de temps.

Le modèle expérimental a permis de tester l'efficacité et la sûreté de moyens thérapeutiques innovateurs par leur composition: extraits d'espèces de plantes qu'on n'a pas utilisées avant dans les parodontopathies (*Filipendula ulmaria*, *Calendula officinalis*) et par leur forme pharmaceutique: gel mucoadhésif.

Ce modèle expérimental a permis de tester l'effet du traitement général par doxycycline et du traitement topique par des extraits de plantes non seulement du point de vue de l'évolution clinique, mais aussi de celui des variations enzymatiques et des changements histologiques.

L'efficacité et la sûreté démontrées des extraits de plantes testés offrent une alternative au traitement immunomodulateur par antibiotiques, qui ont une action principalement systémique, alors que la parodontopathie est une maladie locale.

Par conséquent, les résultats de nos recherches ouvrent de nouvelles perspectives vers l'élaboration de schémas thérapeutiques efficaces, faciles et non-invasifs qui puissent être appliqués couramment à large échelle, pour le bénéfice d'une large catégorie de patients parodontopathiques.