

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Metode inovative de diagnostic și tratament ale bolii parodontale

Doctorand **Vlad ANDREI**

Conducător de doctorat Prof.dr. **Aranka ILEA**



CUPRINS

INTRODUCERE	15
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	
1. Boala parodontală – manifestări clinice	21
1.1. Definiții	21
1.2. Prevalența afecțiunilor parodontale	21
1.3. Factori de risc locali	22
1.4. Factori de risc generali	24
1.5. Examinări clinice ale pacientului parodontopat	26
1.6. Examinări imagistice ale pacientului parodontopat	27
1.7. Clasificarea afecțiunilor parodontale	28
2. Tehnici inovative în diagnosticul bolii parodontale	31
2.1. Instrumente digitale în parodontologie	31
2.2. Identificarea speciilor parodontopatogene	33
2.3. Utilizarea biomarkerilor salivari în diagnosticul precoce al bolii parodontale	33
2.4. Biomarkeri ai metainflamației în boala parodontală	34
3. Tratamentul bolii parodontale	37
3.1. Obiectivele terapiei parodontale	37
3.2. Terapia non-chirurgicală parodontală	37
3.3. Terapia chirurgicală parodontală	39
3.4. Regenerarea parodontală și vindecarea parodontală	39
4. Terapia adjuvantă non-chirurgicală	41
4.1. Utilizarea terapiei antibiotice în terapia inițială	41
4.2. Rolul adjuvant al terapiei laser	41
4.3. Folosirea dispozitivelor air-polishing	42
4.4. Acidul hialuronic	43
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	
1. Ipoteza de lucru/obiective	47
2. Metodologie generală	47
3. Studiul 1 – Evaluarea biomarkerilor metainflamației și a statusului parodontal la un grup populațional din România	51
3.1. Introducere	51
3.2. Ipoteza de lucru/obiective	51
3.3. Material și metodă	52
3.3.1. Înrolarea pacienților	52
3.3.2. Recoltarea fluidelor biologice	52
3.3.3. Evaluarea statusului parodontal	53
3.3.4. Analiza probelor biologice recoltate	53
3.3.5. Analiza statistică a datelor colectate	54
3.4. Rezultate	54
3.5. Discuții	62
3.6. Concluzii	64

4. Studiul 2 - Dezvoltarea și testarea unor materiale inovative pentru tratamentul adjuvant al bolii parodontale - studiu <i>in vitro</i>	67
4.1. Introducere	67
4.2. Ipoteza de lucru/obiective	68
4.3. Material și metodă	68
4.3.1. Adsorbția Doxy pe suprafața particulelor de nano-HAP	68
4.3.2. Realizarea soluției de PLA și nano-HAP + Doxy	69
4.3.3. Augmentarea probelor cu azotat de Ag și nano-Ag	69
4.3.4. Realizarea probelor de studiu prin tehnica de electrospinning și caracterizarea acestora	69
4.3.5. Evaluarea potențialului antimicrobian al probelor de studiu	69
4.3.6. Analiza statistică a datelor colectate	70
4.4. Rezultate	71
4.5. Discuții	76
4.5.1. Eficiența antibioticelor utilizate uzual în tratamentul bolii parodontale asupra bacteriilor parodontopatogene	76
4.5.2. Eficiența antibioticelor din probele de studiu asupra bacteriilor parodontopatogene	77
4.6. Concluzii	78
5. Studiul 3 - Metodă de tratament multimodală și secvențială în controlul metainflamației din boala parodontală- studiu <i>in vivo</i>	79
5.1. Introducere	79
5.2. Ipoteza de lucru/obiective	80
5.3. Material și metodă	81
5.3.1. Alegerea materialului în urma studiului microbiologic	81
5.3.2. Dezvoltarea sistemului mucoadeziv inert	81
5.3.3. Stabilirea protocolului de cercetare	81
5.3.4. Recoltarea probelor biologice	83
5.3.5. Evaluarea parametrilor clinici locali	84
5.3.6. Inducerea bolii parodontale	85
5.3.7. Aplicarea tratamentelor parodontale	85
5.3.8. Evaluarea efectelor tratamentelor aplicate	87
5.3.9. Analiza statistică a datelor colectate	87
5.4. Rezultate	87
5.5. Discuții	97
5.6. Concluzii	101
6. Concluzii generale	103
7. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	105
REFERINȚE	107

CUVINTE-CHEIE

Parodontită, terapie inițială parodontală, terapie non-chirurgicală, meta-inflamație, agenți finali de glicare avansată (AGEs), markeri pro-inflamatori, Interleukina-1, Interleukina-6, Factorul de Necroză Tumorală- α , *electrospinning*, nano-fibre, nano-hidroxiapatită, Doxiciclină, sistem mucoadeziv.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Boala parodontală este una dintre patologiile cronice de la nivelul cavității orale cu un impact negativ major asupra calității vieții și sănătății orale și generale, determinate de pierderea progresivă a țesuturilor responsabile cu menținerea unităților dentare. Odată cu aceste pierderi tisulare, funcțiile cavității orale sunt afectate, ducând la dificultăți în alimentație și, în cazuri severe, fonație. Astfel, dat fiind impactul negativ al bolii parodontale asupra vieții pacienților, elucidarea mecanismelor complexe implicate în etiopatogenia acestei patologii, precum și dezvoltarea de terapii personalizabile cu scopul reducerii inflamației și regenerării țesuturilor pierdute, reprezintă subiecte de actualitate în cercetarea parodontală actuală. În stadiul actual al cunoașterii se face o evaluare holistică a bolii parodontale, aspecte incluse în patru mari capitole, după cum urmează:

1. **Boala parodontală – manifestări clinice** propune enunțarea factorilor locali și generali care intervin în inițierea și progresia bolii parodontale, precum și a elementelor necesare diagnosticării acestei patologii;
2. **Tehnici inovative în diagnosticul bolii parodontale** prezintă succint ultimele inovații utilizate în diagnosticarea rapidă și reproductibilă a parodontitei;
3. **Tratamentul bolii parodontale** oferă o imagine de ansamblu asupra principiilor care ghidează terapia parodontitei;
4. **Terapia adjuvantă non-chirurgicală** presupune enumerarea terapiilor care vin în ajutorul terapiei inițiale parodontale, cu scopul ameliorării parametrilor clinici.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

În urma analizei informațiilor oferite de literatura de specialitate, proiectele experimentale conduse în cadrul programului doctoral au fost organizate în trei studii distincte, oferind o evaluare exhaustivă a patologiei parodontale, a incidenței sale, precum și a unei noi terapii non-chirurgicale parodontale.

1. Studiul 1 – Evaluarea biomarkerilor metainflamației și a statusului parodontal la un grup populațional din România

1.1. Obiective

Primul studiu de cercetare din cadrul tezei de doctorat își propune evaluarea prevalenței bolii parodontale și a severității acesteia în rândul populației, în corelație cu șapte biomarkeri ai metainflamației: carboximetil-lisina (CML), fructo-lisina (FruLys), piralina (Pyr), metilglioxal hidroimidazolona (MG-H1), carboxietil-lisina (CEL), arginina (Arg) și lisina (Lys).

1.2. Material și metodă

Studiul s-a desfășurat la Disciplina de Reabilitare Orală a Facultății de Medicină Dentară din cadrul Universității de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca, în cadrul proiectului internațional COFUND-ERA-HDHL ERANET, Cooperarea Europeană și Internațională - Subprogram 3.2 - Orizont 2020, Programul PNCDI III - Biomarkers for Nutrition and Health. "Innovative Technological Approaches for validation of Salivary AGEs as novel biomarkers in evaluation of risk factors in diet-related diseases" – SALIVAGES, nr. 25/1.09.2017. Proiectul și-a propus o analiză a stării de sănătate a pacienților înrolați, printr-un studiu de tip cohortă umană. Aceștia li s-a realizat anamneza completă, informații referitoare la obiceiurile de consum al produselor de tutun și frecvența periajului dentar fiind înregistrate, precum și examinări clinice locale și generale complexe. Pacienții au fost supuși unui examen parodontal, cu scopul de a evalua prevalența acestei patologii în populația generală. De asemenea, au fost prelevate fluide biologice (salivă și sânge), în vederea unui diagnostic precoce al bolii parodontale, aceste fluide fiind utilizate în evaluarea metainflației (compuși finali de glicare avansată – AGEs) ca biomarkeri ai bolii parodontale.

1.3. Rezultate

Numărul final de pacienți înrolați în prezentul studiu a fost de 159. Dintre aceștia, 11% (n=17) au fost stabili sau sănătoși parodontal, în timp ce 4% (n=7) dintre pacienți au fost diagnosticați cu gingivită, iar un procent de 85% (n=135) au fost diagnosticați cu boală parodontală. Dintre cei 135 de pacienți diagnosticați cu boală parodontală, 18% (n=25) au prezentat stadiul I de parodontită, 21% (n=28) au prezentat stadiul II de parodontită, 35% (n=47) au prezentat stadiul III, în timp ce 26% (n=35) au prezentat stadiul IV de parodontită.

Dintre cei 159 de pacienți înrolați în studiu, 45% (n=71) s-au declarat fumători, în timp ce 55% (n=88) au negat consumul de produse din tutun. În ceea ce privește frecvența periajului dentar individual al pacienților, 34% (n=55) dintre subiecți au raportat că realizează igiena dentară o dată pe zi, 50% (n=79) au raportat că realizează igiena dentară de două ori pe zi, 2% (n=3) au raportat o igienă dentară de trei ori pe zi, în timp ce 14% (n=22) au raportat că realizează igiena individuală a cavității orale mai rar de o dată pe zi.

Referitor la concentrațiile AGEs în cele două biofluide recoltate, trei dintre acestea, determinate la nivel plasmatic, au suferit modificări semnificativ statistice la cei cu forme severe ale bolii parodontale comparativ cu pacienții sănătoși: CML, FruLys și Pyr. Nu au putut fi realizate corelații între concentrațiile plasmatice și cele salivare în cazul celor șapte compuși evaluați.

1.4. Concluzii

Prevalența bolii parodontale este crescută în rândul populației adulte, formele cele mai severe (stadiile III și IV) reprezentând mai mult de 50% dintre cazurile de boală. Severitatea bolii parodontale este influențată direct de consumul de produse din tutun și invers proporțională cu frecvența periajului dentar individual. Trei dintre AGEs-urile plasmatice investigate, CML, FruLys și Pyr au demonstrat un potențial ridicat ca biomarkeri ai bolii parodontale.

2. Studiul 2 – Dezvoltarea și testarea unor materiale inovative pentru tratamentul adjuvant al bolii parodontale - studiu *in vitro*

2.1. Obiective

Prezentul studiu a propus dezvoltarea unui nou biomaterial nano-fibrilar realizat prin tehnica de *electrospinning* și evaluarea efectului său antibacterian asupra două specii de bacterii parodontopatogene. Noul biomaterial a fost realizat din acid polilactic (PLA) și nano-hidroxiapatită (nano-HAP). Pe suprafața nano-HAP a fost adsorbit un compus farmaceutic (Doxiciclina - Doxi), datorită efectului său bactericid și imunomodulator, dependent de doză.

2.2. Material și metodă

Dezvoltarea și evaluările *in vitro* și *in vivo* ale noului biomaterial propus pentru utilizarea ca adjuvant în terapia non-chirurgicală a bolii parodontale, reprezentând cel de-al doilea și cel de-al treilea studiu din prezenta teză doctorală, au fost realizate în cadrul proiectului CNCS-UEFISCDI, PN-III-P2-2.1-PED-2019-3664 „Personalized intelligent matrices for tissue regeneration and meta-inflammation control” (PRIM_TISS), nr. 348PED/03.08.2020, condus de către doamna Prof. dr. Ilea Aranka în perioada 2020-2022.

Nouă loturi de materiale au fost propuse, fiind reprezentate atât materiale cu substanță antibiotică în diferite concentrații, precum și probe de material cu rol de martor (fără substanță activă). Mostre din nano-fibrele obținute au fost caracterizate prin imagini de microscopie electronică de baleiaj. Ulterior s-a efectuat evaluarea *in vitro* pe 2 specii de bacterii parodontopatogene (*Porphyromonas gingivalis* și *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*). Efectului inhibitor antimicrobian al Doxicilinei a fost supusă validării și prin compararea cu alte substanțe medicamentoase folosite frecvent în terapia bolii parodontale (Amoxicilină, Ampicilină și Metronidazol). Evaluarea probelor propuse din noul biomaterial s-a realizat prin tehnici microbiologice, utilizând metoda difuzimetrică Kirby-Bauer.

2.3. Rezultate

Prin tehnica de electrospinning s-au obținut nouă probe de materiale: trei probe conținând PLA 5%, nano-HAP și Doxi în diferite concentrații; o probă conținând PLA 5%, nano-HAP, Doxy 15% și nano-Ag; o probă conținând PLA 8% și azotat de Ag; o probă conținând PLA 8% și azotat de Ag redus cu radiații ultraviolete; o probă de control conținând PLA 5% și nano-HAP simplu în raport de 1.25, precum și două probe de control conținând nanofibre pure de PLA în concentrații de 8%, respectiv 5%.

În ceea ce privește efectul antibacterian al probelor de studiu, conținând Doxi, comparativ cu antibioticele martor frecvent utilizate în terapia adjuvantă parodontală, cele mai mari zone de inhibiție în cazul *A. actinomycetemcomitans* au fost induse de Metronidazol (26.65 mm, SD ± 0.5160), în timp ce *P. gingivalis* a prezentat cele mai mari zone de inhibiție în cazul Doxi (28.74 mm, SD ± 1.242).

Rezultatele obținute în urma testelor microbiologice ale celor nouă probe de studiu asupra speciilor *A. actinomycetemcomitans* și *P. gingivalis* relevă faptul că zonele cele mai mari de inhibiție au fost induse de către proba conținând nano-HAP, PLA 5% și Doxi 20 g/l (32,95 mm, SD ± 0.7199, respectiv 33,1 mm, SD ± 1.537). Nu au fost observate diferențe semnificativ statistice între primele trei probe ca zonă de inhibiție medie.

2.4. Concluzii

Ambele specii bacteriene parodontopatogene, *A. actinomycetemcomitans* și *P. gingivalis*, au fost cultivate cu succes *in vitro*. Ambele specii bacteriene au fost susceptibile la efectele antibacteriene ale antibioticelor utilizate frecvent în terapia non-chirurgicală parodontală: Amoxicilina, Ampicilina, Doxiciclina și Metronidazolul. Evaluarea probelor experimentale, obținute prin electrospinning, bazate pe PLA și nano-Hap + Doxi au demonstrat un efect antimicrobian asupra celor doi patogeni, direct proporțional cu concentrația de Doxi. Probele martor, care nu conțineau substanța antibiotică, nu au demonstrat un efect antimicrobian asupra celor doi parodontopatogeni. Proba pe bază de PLA 5%, conținând 7g/l Doxi și nano-HAP a fost aleasă pentru a fi testată în studiul *in vivo*, dată fiind capacitatea inhibitorie la concentrații scăzute de substanță activă.

3. Studiul 3 – Metodă de tratament multimodală și secvențială în controlul metainflamației din boala parodontală- studiu *in vivo*

3.1. Obiective

Cel de-al treilea studiu al prezentei cercetări doctorale a presupus testarea potențialului noului material obținut prin electrospinning și ales în urma evaluării anterioare (prin studiu *in vitro*), pe model animal, pentru a determina potențialul său ca adjuvant al terapiei bolii parodontale și a investiga efectul imunomodulator pe care acesta îl poate exercita.

3.2. Material și metodă

Studiul experimental s-a realizat pe sobolani rasă Wistar, organizați în patru loturi de studiu: lotul control negativ (specimene fără inducerea bolii parodontale), lotul control pozitiv (specimene cu boală parodontală indusă, dar fără vreo intervenție terapeutică), lotul de test 1 (specimene cu boală parodontală indusă, tratate secvențial prin terapie non-chirurgicală parodontală și aplicarea noului biomaterial), și lotul de test 2 (specimene cu boală parodontală indusă și tratată doar prin chiuretaj mecanic simplu). Boala parodontală a fost indusă prin tehnica ligaturii la nivelul incisivilor inferiori ai specimenelor.

Efectele bolii parodontale și ale tratamentelor evaluate au fost determinate prin examen clinic local, utilizând indicele de mobilitate dentară și indicele gingival, prin determinarea prin tehnică ELISA a concentrațiilor matrix-metaloproteinazei-8 (MMP-8), interleukinei-1 (IL-1), interleukinei-6 (IL-6) și factorului de necroză tumorală alfa (TNF- α) de la nivel salivar și, respectiv, plasmatic, precum și prin examinări histologice.

3.3. Rezultate

Aplicarea firelor de mătase circumdentare a decurs cu succes la toți subiecții incluși în loturile control pozitiv, test 1 și test 2, iar noul biomaterial produs prin electrospinning a fost introdus cu succes în pungile parodontale ale subiecților grupului test 1.

În urma evaluării rezultatelor terapeutice, cele mai mici scoruri ale mobilității dentare (0,6522, SD \pm 0,4870), precum și ale indexului gingival (0,4340, SD \pm 0,5069) au fost observate în cazul grupului test 1. Referitor la concentrațiile salivare ale MMP-8, grupul test 1 a avut concentrații salivare semnificativ statistice mai mici ($p < 0,05$) ale MMP-8 (2,549 ng/ml, SD \pm 1,209), comparativ cu grupul test 2 (4,471 ng/ml, SD \pm 0,6723). În mod similar, concentrațiile plasmatică ale IL-1 din grupul test 1 (49,38 \pm 14,72 ng/ml) au fost semnificativ mai mici ($p < 0,05$) decât în grupul test 2 (67,95 ng/ml, SD \pm 6,445), iar concentrațiile plasmatică ale TNF- α au fost

semnificativ statistic mai mici ($p < 0,05$) în cazul grupului teste 1 (13,36 ng/ml, SD \pm 0,8970), față de grupul test 2 (20,88 ng/ml, SD \pm 4,851).

Referitor la examenul histologic, inducerea parodontitei localizate a fost confirmată prin prezența în epiteliul gingival a unor zone de necroză și ulcerații, asociate cu un infiltrat inflamator dens în lamina propria subiacentă. De asemenea, ligamentul parodontal a prezentat zone extinse de inflamație cronică, cu edem, vase sanguine dilatate și infiltrat inflamator. După aplicarea tratamentului, în grupul test 1, epiteliul gingival a prezentat o vindecare parțială: în zone limitate, epiteliul a prezentat o grosime redusă, în timp ce în altele, epiteliul avea o structură normală.

3.4. Concluzii

Boala parodontală a fost indusă cu succes șobolanilor de rasă Wistar prin tehnica ligaturii la nivelul incisivilor inferiori. Inducerea a fost confirmată prin parametrii clinici și examinări histologice, precum și prin creșterea concentrațiilor MMP-8 salivari și IL-1 și TNF- α . Scăderea concentrației salivare a MMP-8, precum și a concentrațiilor plasmatice ale IL-1 și TNF- α , dovedesc efectul imunomodulator al noului biomaterial obținut prin electrospinning, precum și controlul metainflamației. După aplicarea terapiilor parodontale, nivelul acestor biomarkeri au suferit scăderi, conform tehnicilor terapeutice aplicate. Astfel, materialul propus reprezintă un candidat pentru terapia adjuvantă a bolii parodontale, ca o nouă modalitate de tratament secvențial și multimodal al acesteia.

Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

Originalitatea și inovativitatea prezentei lucrări doctorale constă în abordarea extensivă a bolii parodontale într-un studiu de tip cohortă umană, precum și validarea pe model animal a unui nou protocol terapeutic în terapia secvențială și multimodală a bolii parodontale. Acestea sunt susținute de următoarele aspecte:

1. **Abordarea comprehensivă a unei cohorte umane** legată de prevalența bolii parodontale, stratificarea pacienților în funcție de severitatea bolii parodontale și corelarea acesteia cu factori favorizanți ai patologiei.
2. **Evaluarea bolii parodontale prin prisma metainflamației** și a concentrației salivare și plasmatice a agenților de glicare.
3. **Dezvoltarea unui nou biomaterial cu structură nano-fibrilară** prin tehnica de electrospinning, pe bază de PLA și nano-HAP + Doxy, concentrația de 7g/l de Doxy dovedindu-se a fi cea mai potrivită pentru inhibiția celor două specii parodontopatogene utilizate în studiile microbiologice (*A. actinomycetemcomitans* și *P. gingivalis*), având efectul inhibitor optim la concentrația cea mai scăzută de substanță antibiotică.
4. Aplicarea locală a noului biomaterial dezvoltat a realizat **imunomodularea și reducerea metainflamației**.
5. **Sigilarea pungilor parodontale cu ajutorul noului sistem mucoadeziv dezvoltat** pentru eliberarea de lungă durată a compușilor activi din acesta la nivelul pungii parodontale.

Dezvoltarea unui nou protocol secvențial și multimodal al terapiei parodontale non-chirurgicale, prin imunomodularea parametrilor metainflamației (MMP-8, IL-1, TNF- α), după cum urmează: (i) îndepărtarea biofilmului și a cementului necrotic de la nivelul pungilor parodontale prin chiuretaj; (ii) aplicarea noului biomaterial pe bază de PLA și nano-HAP + Doxy

7g/l la nivelul pungii parodontale; (iii) sigilarea pungii parodontale prin aplicarea sistemului mucoadeziv.

PhD THESIS ABSTRACT

Innovative techniques in the diagnosis and treatment of periodontitis

PhD Student **Vlad ANDREI**

PhD Coordinator Prof.dr. **Aranka ILEA**



TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION	15
CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	
1. Periodontitis – clinical manifestations	21
1.1. Definitions	21
1.2. Prevalence of periodontal pathologies	21
1.3. Local risk factors	22
1.4. General risk factors	24
1.5. Clinical examinations of the patient suffering of periodontitis	26
1.6. Radiological examinations of the patient suffering of periodontitis	27
1.7. Classification of periodontal pathologies	28
2. Innovative techniques in the diagnostic of periodontitis	31
2.1. Digital instruments in periodontology	31
2.2. Identification of periodontal pathogens	33
2.3. The use of periodontal biomarkers in the early diagnosis of periodontitis	33
2.4. Biomarkers of meta-inflammation in periodontitis	34
3. The treatment of periodontitis	37
3.1. The objectives of periodontal treatment	37
3.2. The non-surgical periodontal treatment	37
3.3. The surgical periodontal treatment	39
3.4. Periodontal regeneration versus periodontal healing	39
4. The adjuvant non-surgical periodontal treatment	41
4.1. Antibiotics in the first phase periodontal treatment	41
4.2. Laser as adjuvant in periodontal treatment	41
4.3. The use of air-polishing devices	42
4.4. Hyaluronic acid	43
PERSONAL CONTRIBUTION	
1. Objectives	47
2. General methodology	47
3. 1st STUDY – Evaluation of biomarkers of meta-inflammation and the periodontal status in a population group from Romania	51
3.1. Introduction	51
3.2. Objectives	51
3.3. Material and methods	52
3.3.1. <i>Patients' enrolment</i>	52
3.3.2. <i>Biological fluids collection</i>	52
3.3.3. <i>Periodontal examination</i>	53
3.3.4. <i>Analysis of the collected samples</i>	53
3.3.5. <i>Statistical analysis of the collected data</i>	54
3.4. Results	54
3.5. Discussions	62
3.6. Conclusions	64

4. 2nd STUDY - Development and evaluation of innovative materials for adjuvant treatment of periodontal disease – an <i>in vitro</i> study	67
4.1. Introduction	67
4.2. Objectives	68
4.3. Material and methods	68
4.3.1. <i>The absorption of Doxy on the surface of nano-HAP particles</i>	68
4.3.2. <i>Creation of the PLA and nano-HAP + Doxy solution</i>	69
4.3.3. <i>The addition of Ag and nano-Ag</i>	69
4.3.4. <i>Sample creation through electrospinning and characterisation</i>	69
4.3.5. <i>Evaluation of the antimicrobial potential of the samples</i>	69
4.3.6. <i>Statistical analysis of the collected data</i>	70
4.4. Results	71
4.5. Discussions	76
4.5.1. <i>The effectiveness of antibiotics commonly used in the treatment of periodontal disease on periodontopathogenic bacteria</i>	76
4.5.2. <i>Efficacy of antibiotics in study samples on periodontopathogenic bacteria</i>	77
4.6. Conclusions	78
5. 3rd STUDY - Multimodal and sequential treatment method in the control of meta-inflammation in periodontal disease – an <i>in vivo</i> study	79
5.1. Introduction	79
5.2. Objectives	80
5.3. Material and methods	81
5.3.1. <i>The choice of sample following the microbiological study</i>	81
5.3.2. <i>Development of the inert mucoadhesive system</i>	81
5.3.3. <i>Establishing the research protocol</i>	81
5.3.4. <i>Collection of biological samples</i>	83
5.3.5. <i>Evaluation of local clinical parameters</i>	84
5.3.6. <i>Induction of periodontal disease</i>	85
5.3.7. <i>Application of periodontal treatments</i>	85
5.3.8. <i>Evaluation of the effects of applied treatments</i>	87
5.3.9. <i>Statistical analysis of the collected data</i>	87
5.4. Results	87
5.5. Discussions	97
5.6. Conclusions	101
6. General conclusions	103
7. The originality and innovative contributions of the thesis	105
References	107

Keywords

Periodontitis, initial periodontal therapy, non-surgical therapy, meta-inflammation, advanced glycation end agents (AGEs), pro-inflammatory markers, Interleukin-1, Interleukin-6, Tumour Necrosis Factor- α , electrospinning, nano-fibres, nano-hydroxyapatite, Doxycycline, mucoadhesive system.

CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

Periodontitis is one of the chronic pathologies of the oral cavity with a major negative impact on the quality of life, as well as on the oral and general health, determined by the progressive loss of the tissues responsible for maintaining dental units. Along with these tissue losses, the functions of the oral cavity are affected, leading to difficulties in feeding and, in severe cases, phonation. Thus, given the negative impact of periodontal disease on patients' lives, the elucidation of the complex mechanisms involved in the etiopathogenesis of this pathology, as well as the development of customizable therapies aimed at reducing inflammation and regenerating lost tissues, are current topics in current periodontal research. In the current state of knowledge, a holistic assessment of periodontal disease is made, aspects included in four large chapters, as follows:

1. **Periodontitis – clinical manifestations** propose the statement of local and general factors that intervene in the initiation and progression of periodontal disease, as well as the elements necessary to diagnose this pathology;
2. **Innovative techniques in the diagnosis of periodontal disease** briefly presents the latest innovations used in the rapid and reproducible diagnosis of periodontitis;
3. **The treatment of periodontal disease** provides an overview of the principles that guide the therapy of periodontitis;
4. **The adjuvant non-surgical periodontal treatment** involves listing therapies that help the initial periodontal therapy, with the aim of improving clinical parameters.

PERSONAL CONTRIBUTION

Following the analysis of the information provided by the medical literature, the experimental projects conducted within the doctoral program were organized into three distinct studies, providing an exhaustive evaluation of periodontal pathology, its incidence, as well as a new non-surgical periodontal therapy.

1. 1st STUDY – Evaluation of biomarkers of meta-inflammation and the periodontal status in a population group from Romania

1.1. Objectives

The first research study of the doctoral thesis aims to evaluate the prevalence of periodontal disease and its severity among the adult population, in correlation with seven biomarkers of meta-inflammation: carboxymethyl-lysine (CML), fructo-lysine (FruLys), pyralin (Pyr), methylglyoxal hydroimidazolone (MG-H1), carboxyethyl-lysine (CEL), arginine (Arg) and lysine (Lys).

1.2. Material and methods

The study was conducted at the Oral Rehabilitation Discipline of the Faculty of Dental Medicine within the "Iuliu Hațieganu" University of Medicine and Pharmacy Cluj-Napoca, within the COFUND-ERA-HDHL ERANET international project, European and International Cooperation - Subprogram 3.2 - Horizon 2020, Program PNCDI III - Biomarkers for Nutrition and Health. "Innovative Technological Approaches for validation of Salivary AGEs as novel biomarkers in evaluation of risk factors in diet-related diseases" - SALIVAGES, no. 25/1/09/2017. The project proposed an analysis of the health status of the enrolled patients, through a human cohort study. They had a complete history taken, information on tobacco consumption habits and tooth brushing frequency being recorded, as well as complex local and general clinical examinations. The patients underwent a periodontal examination to assess the prevalence of this pathology in the general population. Also, biological fluids (saliva and blood) were collected, these fluids being used in the evaluation of metainflammation (advanced glycation end compounds - AGEs) as biomarkers of periodontal disease.

1.3. Results

The final number of patients enrolled in the present study was 159. Out of these patients, 11% (n=17) were periodontally stable or healthy, while 4% (n=7) of patients were diagnosed with gingivitis, and 85% (n=135) were diagnosed with periodontal disease. Among the 135 patients diagnosed with periodontal disease, 18% (n=25) presented stage I of periodontitis, 21% (n=28) presented stage II of periodontitis, 35% (n=47) presented stage III, while 26% (n=35) presented stage IV periodontitis.

Among the 159 patients enrolled in the study, 45% (n=71) declared themselves as smokers, while 55% (n=88) denied the consumption of tobacco products. Regarding the frequency of individual tooth brushing of the patients, 34% (n=55) of the subjects reported that they perform dental hygiene once a day, 50% (n=79) reported that they perform dental hygiene twice a day, 2% (n=3) reported dental hygiene three times a day, while 14% (n=22) reported performing individual oral hygiene less than once a day.

Regarding the concentrations of AGEs in the two collected biofluids, three of them, determined in plasma, underwent statistically significant changes in those patients with severe forms of periodontal disease compared to healthy patients: CML, FruLys and Pyr. No correlations could be made between plasma and salivary concentrations for the seven compounds evaluated.

1.4. Conclusions

The prevalence of periodontal disease is increased among the adult population, with the most severe forms (stages III and IV) accounting for more than 50% of cases of the disease. The severity of periodontal disease is directly influenced by the consumption of tobacco products and inversely proportional to the frequency of individual tooth brushing. Three of the investigated plasmatic AGEs (CML, FruLys and Pyr) demonstrated a high potential as periodontal disease biomarkers.

2. 2nd STUDY - Development and evaluation of innovative materials for adjuvant treatment of periodontal disease – an *in vitro* study

2.1. Objectives

The present study proposed the development of a new nano-fibrillar biomaterial made using the electrospinning technique and the subsequent evaluation of its antibacterial effect on two species of periodontopathogenic bacteria. The new biomaterial was made from polylactic acid (PLA) and nano-hydroxyapatite (nano-HAP). A pharmaceutical compound (Doxycycline - Doxy) was adsorbed on the nano-HAP surface, due to its dose-dependent bactericidal and immunomodulatory effect.

2.2. Material and methods

The development, as well as the *in vitro* and *in vivo* evaluations of the new biomaterial proposed for use as an adjuvant in the non-surgical therapy of periodontal disease, representing the second and third studies of this doctoral thesis, were carried out within the CNCS project - UEFISCDI, PN-III-P2-2.1-PED-2019-3664 "Personalized intelligent matrices for tissue regeneration and meta-inflammation control" (PRIM_TISS), no. 348PED/03.08.2020, led by Prof. Dr. Ilea Aranka between 2020-2022.

Nine samples of materials were proposed, representing both materials with antibiotic substance in different concentrations, as well as material samples with a role of control (without active substance). Samples of the obtained nano-fibres were characterized by scanning electron microscopy images. Subsequently, the *in vitro* evaluation was performed on 2 species of periodontopathogenic bacteria (*Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*). The antimicrobial inhibitory effect of Doxy was also subjected to validation by comparison to other medicinal substances frequently used in the therapy of periodontal disease (Amoxicillin, Ampicillin and Metronidazole). The evaluation of the proposed samples from the new biomaterial was carried out by microbiological techniques, using the Kirby-Bauer diffusometric method.

2.3. Results

Through the electrospinning technique, nine material samples were obtained: three samples containing PLA 5%, nano-HAP and Doxy in different concentrations; a sample containing PLA 5%, nano-HAP, Doxy 15% and nano-Ag; a sample containing 8% PLA and Ag nitrate; a sample containing 8% PLA and UV-reduced Ag nitrate; a control sample containing 5% PLA and simple nano-HAP in a ratio of 1.25, as well as two control samples containing pure PLA nanofibers in concentrations of 8% and 5%, respectively.

Regarding the antibacterial effect of the study samples, containing Doxy, compared to control antibiotics commonly used in adjuvant periodontal therapy, the largest zones of inhibition in the case of *A. actinomycetemcomitans* were induced by Metronidazole (26.65 mm, SD \pm 0.5160), while *P. gingivalis* presented the largest zones of inhibition in the case of Doxi (28.74 mm, SD \pm 1.242).

The results obtained from the microbiological tests of the nine study samples on the species *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis* reveal that the largest zones of inhibition were induced by the sample containing nano-PAH, PLA 5% and Doxy 20 g/l (32.95 mm, SD \pm 0.7199,

respectively 33.1 mm, SD \pm 1.537). No statistically significant differences were observed between the first three samples as mean inhibition zone.

2.4. Conclusions

Both periodontopathogenic bacterial species, *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis*, have been successfully cultured *in vitro*. Both bacterial species were susceptible to the antibacterial effects of antibiotics frequently used in non-surgical periodontal therapy: Amoxicillin, Ampicillin, Doxycycline and Metronidazole. The evaluation of the experimental samples, obtained by electrospinning, based on PLA and nano-Hap + Doxy demonstrated an antimicrobial effect on the two pathogens, directly proportional to the Doxy concentration. The control samples, which did not contain the antibiotic substance, did not demonstrate an antimicrobial effect on the two periodontopathogens. The sample based on PLA 5%, containing 7g/l Doxy and nano-PAH was chosen to be tested in the *in vivo* study, given the inhibitory capacity at low concentrations of active substance.

3. 3rd STUDY - Multimodal and sequential treatment method in the control of meta-inflammation in periodontal disease - an *in vivo* study

3.1. Objectives

The third study of the present doctoral research involved testing the potential of the new material obtained by electrospinning and chosen following the previous evaluation (by *in vitro* study), in an animal model, to determine its potential as an adjunct to the therapy of periodontal disease and to investigate the immunomodulatory effect it can exert.

3.2. Material and methods

The experimental study was carried out on Wistar rats, organized into four study groups: the negative control group (specimens without the induction of periodontal disease), the positive control group (specimens with induced periodontal disease, but without any therapeutic intervention), test group 1 (specimens with induced periodontal disease, treated sequentially by non-surgical periodontal therapy and application of the new biomaterial), and test group 2 (specimens with induced periodontal disease and treated only by simple mechanical curettage). The localised periodontal disease was induced by ligature technique in the lower incisors of the specimens.

The effects of periodontitis and the evaluated treatments were determined by local clinical examination, using the dental mobility index and the gingival index, by determining by ELISA the concentrations of matrix-metalloproteinase-8 (MMP-8), interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) at salivary and plasma levels, respectively, as well as by histological examinations.

3.3. Results

The application of circumdental silk threads was successful in all subjects included in the positive control, test 1 and test 2 groups, and the new biomaterial produced by electrospinning was successfully inserted into the periodontal pockets of the test group 1 subjects.

Following the evaluation of the therapeutic results, the lowest scores of tooth mobility (0.6522, SD \pm 0.4870) as well as of the gingival index (0.4340, SD \pm 0.5069) were observed in the

case of test group 1. Regarding salivary concentrations of MMP-8, test group 1 had statistically significantly lower ($p < 0.05$) salivary concentrations of MMP-8 (2.549 ng/ml, SD \pm 1.209) compared to test group 2 (4.471 ng/ml, SD \pm 0.6723). Similarly, IL-1 plasma concentrations in test group 1 (49.38 \pm 14.72 ng/ml) were significantly lower ($p < 0.05$) than in test group 2 (67.95 ng/ml, SD \pm 6.445), and the plasma concentrations of TNF- α were statistically significantly lower ($p < 0.05$) in the case of test group 1 (13.36 ng/ml, SD \pm 0.8970), compared to the test group 2 (20.88 ng/ml, SD \pm 4.851).

Regarding the histological examination, the induction of localized periodontitis was confirmed by the presence in the gingival epithelium of areas of necrosis and ulceration, associated with a dense inflammatory infiltrate in the underlying lamina propria. The periodontal ligament also showed extensive areas of chronic inflammation, with edema, dilated blood vessels, and inflammatory infiltrate. After treatment, in test group 1, the gingival epithelium showed partial healing: in limited areas, the epithelium showed reduced thickness, while in others, the epithelium had a normal structure.

3.4. Conclusions

Periodontitis was successfully induced in Wistar rats by way of the lower incisor ligation technique. The induction of inflammation was confirmed by clinical parameters and histological examinations, as well as by increased concentrations of salivary MMP-8, IL-1 and TNF- α . The decrease in the salivary concentration of MMP-8, as well as the plasmatic concentrations of IL-1 and TNF- α , prove the immunomodulatory effect of the new biomaterial obtained by electrospinning, as well as the control of meta-inflammation. After the application of periodontal therapies, the level of these biomarkers decreased, in accordance with the applied therapeutic techniques. Thus, the proposed material is a candidate for the adjunctive therapy of periodontal disease, as a new way of its sequential and multimodal treatment.

The originality and innovative contributions of the thesis

The originality and innovation of this doctoral work consists in the extensive approach to periodontal disease in a human cohort study, as well as the animal model validation of a new therapeutic protocol in the sequential and multimodal therapy of periodontal disease. They are supported by the following aspects:

1. **The comprehensive approach of a human cohort** related to the prevalence of periodontal disease, the stratification of patients according to the severity of periodontal disease and its correlation with factors favouring the initiation and progression of the pathology.
2. The evaluation of periodontal disease through the lens of **meta-inflammation and salivary and plasma concentration of glycation agents**.
3. The **development of a new biomaterial with a nano-fibrillar structure** through the electrospinning technique, based on PLA and nano-HAP + Doxy, the concentration of 7g/l of Doxy proving to be the most suitable for the inhibition of the two periodontopathogenic species used in microbiological studies (*A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis*), having the optimal inhibitory effect at the lowest concentration of antibiotic substance.
4. Local application of the newly developed biomaterial achieved **immunomodulation and reduction of meta-inflammation**.

5. **Sealing of the periodontal pockets** with the help of the **new mucoadhesive system** developed for the long-term release of its active compounds at the level of the periodontal pocket.

Development of a new sequential and multimodal protocol of non-surgical periodontal therapy, through immunomodulation of meta-inflammation parameters (MMP-8, IL-1, TNF- α), as follows: (i) removal of biofilm and necrotic cementum from periodontal pockets by curettage; (ii) application of the new biomaterial based on PLA and nano-HAP + Doxy 7g/l at the level of the periodontal pocket; (iii) sealing the periodontal pocket by applying the mucoadhesive system.