

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Markeri de expunere bacteriană sistemică în boala parodontală și riscul afecțiunilor cardiovasculare

Doctorand: **Anca Ionel**

Conducător de doctorat: **Prof. Dr. Radu Septimiu Câmpian**

CLUJ-NAPOCA 2016



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	1
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	
1. Aspecte clinice și etiopatogenetice în boala parodontală	5
1.1. Forme clinice ale bolii parodontale. Clasificare	5
1.2. Etiopatogeneza bolii parodontale	6
1.2.1. Factorul determinant microbian în etiologia bolii parodontale	6
1.2.2. Factori favorizanți locali	7
1.2.3. Factori favorizanți generali	7
1.2.4. Mecanismele patogenetice în evoluția bolii parodontale	8
1.2.4.1. Mecanisme directe de patogenitate	8
1.2.4.2. Mecanisme indirecte de patogenitate	9
2. Markerii inflamatori sistemici implicați în boala parodontală	11
2.1. Răspunsul imunomodulator al organismului gazdă și relevanța markerilor inflamatori	11
2.1.1. Proteina C reactivă	12
2.1.2. Fibrinogenul	14
2.1.3. Citokinele proinflamatorii	14
2.1.3.1. Interleukine	14
2.1.3.2. Factorul de necroză tumorală alfa	16
2.1.3.3. Chemochinele	16
2.1.4. Metaloproteinazele matriceale	17
2.2. Metode utilizate în determinarea markerilor inflamatori în boala parodontală	17
3. Actualități privind asocierea bolii parodontale cu afecțiunile sistemice	19
3.1. Concepte actuale privind relația de cauzalitate dintre boala parodontală și afecțiunile cardiovasculare	19
3.1.1. Implicațiile parodontitei în etiopatogenia aterosclerozei	20
3.1.2. Mediatorii inflamatori sistemici asociați bolii parodontale și patologiei cardiovasculare	20
3.2. Relația boala parodontală-diabet zaharat	21
3.3. Relația boala parodontală- sindrom metabolic	21
4. Modalități de abordare terapeutică în boala parodontală	23
4.1. Algoritm terapeutic general- tratament parodontal convențional	23
4.2. Tratamentul medicamentos adjuvant în boala parodontală	24
4.3. Implicațiile sistemice ale tratamentului parodontal	25
4.4. Rolul ingineriei tisulare în boala parodontală	25
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	
1. Ipoteza de lucru/obiective	29
2. Metodologie generală	31
2.1. Metodologia pentru cercetările clinice	31
2.2. Metodologia pentru cercetările experimentale	34
2.3. Metodologia pentru studiul epidemiologic de prevalență	40
3. Studiul 1 - Cercetări privind corelația dintre boala parodontală și markerii inflamatori sistemici	43
3.1. Introducere	43
3.2. Ipoteza de lucru/obiective	44
3.3. Material și metodă	44
3.4. Rezultate	46
3.5. Discuții	51

3.6. Concluzii	54
4. Studiul 2 - Validarea unui protocol experimental de inducere a patologiei parodontale pe model animal	55
4.1. Introducere	55
4.2. Ipoteza de lucru/obiective	56
4.3. Material și metodă	58
4.4. Rezultate	59
4.5. Discuții	62
4.6. Concluzii	64
5. Studiul 3- Evaluarea răspunsului inflamator sistemic în boala parodontală indusă experimental	65
5.1. Introducere	65
5.2. Ipoteza de lucru/obiective	66
5.3. Material și metodă	66
5.4. Rezultate	67
5.5. Discuții	69
5.6. Concluzii	71
6. Studiul 4- Evaluarea efectului pleiotropic local și sistemic al statinelor și al metforminei în terapia parodontală- studiu pe model animal	73
6.1. Introducere	73
6.2. Ipoteza de lucru/obiective	75
6.3. Material și metodă	76
6.4. Rezultate	79
6.5. Discuții	99
6.6. Concluzii	105
7. Studiul 5- Cercetări privind eficiența utilizării celulelor stem foliculare în terapia parodontală –studiu experimental	107
7.1. Introducere	107
7.2. Ipoteza de lucru/obiective	108
7.3. Material și metodă	108
7.4. Rezultate	110
7.5. Discuții	115
7.6. Concluzii	117
8. Studiul 6- Analiza relației dintre boala parodontală și patologia cardiovasculară- studiu epidemiologic observațional	119
7.1. Introducere	119
7.2. Ipoteza de lucru/obiective	120
7.3. Material și metodă	120
7.4. Rezultate	121
7.5. Discuții	128
7.6. Concluzii	130
9. Concluzii generale	131
10. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	133
REFERINȚE	135
ANEXE	152

Cuvinte cheie : boala parodontală, markeri inflamatori sistemici, hsCRP, IL-6, afecțiuni cardiovasculare, statine, model experimental animal, terapie parodontală

INTRODUCERE

Boala parodontală și afecțiunile cardiovasculare prezintă o prevalență crescută în rândul populației și o dimensiune a relației dintre acestea ar putea avea răsunet asupra multor indivizi. Cunoașterea complexă a aspectelor care vizează patogenia, evoluția și tratamentul bolii parodontale devine un subiect de mare interes datorită implicațiilor sistemice ale acestei afecțiuni, parodontita fiind considerată în prezent un factor de risc independent pentru afecțiunile cardiovasculare și cerebrovasculare.

Relația de cauzalitate dintre boala parodontală și afecțiunile sistemice este susținută de premise conform cărora, implicarea răspunsului sistemic la acțiunea agenților patogeni parodontali determină modificări în dinamica mediatorilor inflamatori, favorizând mecanismele aterosclerozei și a complicațiilor coronariene ale acesteia. Markerii inflamatori sistemici devin astfel instrumente utile în identificarea rezoluției sistemice a proceselor inflamatorii parodontale.

Cercetările ultimilor ani integrează conceptul de "medicină parodontală" în practica clinică și subliniază importanța fundamentării cunoștințelor actuale privind implicațiile sistemice ale parodontitei precum și necesitatea unui management corespunzător al pacienților în vederea îmbunătățirii calității vieții acestora, cu prevenirea posibilelor complicații. Obiectivul general al prezentei teze de doctorat a fost obținerea de noi informații privind expresia sistemică a patologiei parodontale, precum și testarea a diferite modalități terapeutice inovative, cu impact asupra statusului parodontal și a stării generale de sănătate.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

În cele patru capitole din partea de cercetare teoretică a tezei sunt trecute în revistă aspecte recente legate de: formele clinice și mecanismele etiopatogenetice ale bolii parodontale, markerii inflamatori sistemici implicați în patologia parodontală, asocierea parodontitei cu afecțiunile cardiovasculare precum și modalități de abordare terapeutică în boala parodontală.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Secțiunea de contribuție personală cuprinde studiile desfășurate în cadrul cercetărilor doctorale, descrierea lor fiind precedată de expunerea ipotezei de lucru, a obiectivelor și a metodologiei generale.

Ipoteza de lucru/Obiective

Lucrarea de față pornește de la premisa că infecția locală specifică bolii parodontale poate perturba nivelele mediatorilor inflamatori sistemici – promovând astfel mecanismele aterosclerozei și a complicațiilor coronariene ale acesteia. Evidențe recente sugerează că indivizii cu boală parodontală prezintă un risc crescut pentru dezvoltarea afecțiunii cardiovasculare, independent de alți factori de risc comportamentali sau medicali cunoscuți și poate fi corelat cu gravitatea parodontitei. În ultimii ani s-a încercat identificarea de noi opțiuni terapeutice cu efect de prevenire a pierderii osoase și de inhibare a citokinelor proinflamatorii, cu efect benefic atât asupra statusului parodontal cât și asupra stării generale de sănătate. Statinele și metformina, substanțe utilizate pe scară largă în tratamentul unor tulburări metabolice au dobândit un rol potențial în terapia parodontală regenerativă determinând creșterea densității osoase și remodelarea parodontiului de susținere. Celulele stem și tehnicile de inginerie tisulară câștigă interes în cercetarea științifică în parodontologie.

În contextul expus anterior, cercetările din prezenta lucrare de doctorat se bazează pe efectuarea unui studiu clinic, a unor cercetări experimentale și a unui studiu epidemiologic de prevalență de tip "cross-sectional" și are obiective reprezentative pentru tema aleasă.

Studiul clinic are ca obiective :

- Evaluarea relației dintre nivelul seric al proteinei C reactive înalt sensibile (hsCRP), ca marker inflamator de risc pentru afecțiunile cardiovasculare și prezența bolii parodontale; analizarea răspunsului sistemic al organismului la tratamentul parodontal convențional prin determinări ale markerilor inflamatori și ale profilelor lipidice înainte și după terapia aplicată.

Studiile experimentale vizează următoarele aspecte:

- Validarea unui model experimental original și reproductibil pentru boala parodontală la șobolanul Wistar, similar patologiei umane;
- Evaluarea dinamicii markerilor hematologici și imunologici, prin efectuarea unor determinări specifice pe parcursul inducerii patologiei parodontale;
- Evaluarea efectului pleiotropic local și sistemic al simvastatinei și metforminei, utilizate ca preparate adjuvante pentru terapia parodontală convențională, pe modelul experimental de parodontită indusă la șobolanul Wistar;
- Evaluarea eficienței unui preparat sub formă de gel pe bază de celule stem foliculare, pe modelul experimental de parodontită indusă la șobolanul Wistar;

Studiul epidemiologic observațional, transversal urmărește :

- Prevalența afecțiunilor sistemice la pacienții cu boală parodontală, analizarea factorilor de risc comuni ai acestor afecțiuni precum și relația de cauzalitate posibilă între afecțiunile amintite prin intermediul unui chestionar conceput și validat în acest scop.

Menționăm că studiile s-au desfășurat cu acordul Comisie de Etică a Universității de Medicină și Farmacie "Iuliu Hațieganu", în conformitate cu legislația actuală privind etica cercetării clinice și experimentale.

Studiul 1. Cercetări privind corelația dintre boala parodontală și markerii inflamatori sistemici

Introducere/Obiective

Având în vedere apariția bolii parodontale și a afecțiunilor cardiovasculare la vârste tot mai tinere în ultimii ani, scopul prezentului studiu a fost de a investiga dacă nivelurile circulante ale proteinei C reactive înalt sensibilă (hsCRP- marker inflamator-cardiovascular) pot fi influențate de terapia parodontală, la pacienți cu parodontită și fără afecțiuni sistemice detectabile. Am urmărit, de asemenea, identificarea corelațiilor dintre parametrii parodontali specifici și valorile hsCRP. Un alt obiectiv al cercetării de față a vizat includerea în studiu a unor grupuri de pacienți constituite din adulți tineri, sănătoși sistemic dar cu boală parodontală prezentă cu scopul de a estima riscul acestora de a dezvolta în timp afecțiuni cardiovasculare, pe baza valorilor serice ale hsCRP.

Material și metodă

Studiul a cuprins pacienți adulți, cu vârsta cuprinsă între 18-45 ani, sănătoși sistemic care au fost distribuiți în două loturi, în funcție de diagnosticul parodontal: lotul caz (C; n=12) a inclus pacienți cu boală parodontală și lotul martor (M;n=14) a inclus pacienți fără parodontită. Valorile parametrilor parodontali (indice parodontal Russel-PI, indice de placă-IP, indice de sângerare gingivală-GBI, adâncimea la sondare-PD) și valorile hsCRP, colesterol total, HDL și glicemie au fost determinate la vizita inițială și la vizitele de evaluare de la 2 săptămâni și 2 luni. Pacienții din lotul martor (M) nu au necesitat tratament parodontal, acesta fiind aplicat doar participanților incluși în lotul caz (C). Protocolul terapeutic parodontal a presupus: motivarea privind menținerea sănătății parodontale prin însușirea tehnicilor corecte de igienizare, detartraj supragingival și subgingival, planare radiculară și înlăturarea conținutului pungilor parodontale cu crearea condițiilor locale favorabile pentru vindecare. Datele au fost analizate statistic utilizând aplicația SPSS (versiunea 17.0 pentru Windows) și Statistica 8.0.

Rezultate

Valorile inițiale ale markerului inflamator hsCRP au fost semnificativ mai mari pentru pacienții cu parodontită comparativ cu cei din lotul martor ($p=0,003$). Au fost observate diferențe semnificative statistic între loturi privind valorile inițiale ale indicilor parodontali: PI, GBI, IP, și PD ($p<0.001$). Valorile hsCRP inițiale pentru cei 26 de pacienți luați în studiu s-au corelat pozitiv, semnificativ statistic cu indicele parodontal PI ($r=0.47$; $p=0.01$) și cu adâncimea la sondare PD ($r=0.41$; $p=0.03$). La vizitele de evaluare pentru pacienții din lotul C s-a observat ca valorile markerului hsCRP au scăzut în urma terapiei parodontale, dar fără diferențe semnificative statistic față de valorile inițiale ($p=0,10$; $p=0,07$). Au fost identificate diferențe semnificative statistic între pacienții din lotul M și lotul C privind încadrarea acestora în categoriile de risc cardiovascular, în funcție de valorile hsCRP ($p=0.03$). Astfel, 71.43% dintre pacienții din lotul M se încadrează în categoria de risc scăzut (hsCRP < 1 mg/L) față de 25 % dintre pacienții din lotul C. Un procent de 25% din lotul C face parte din categoria de risc crescut (hsCRP > 3 mg/L) față de 0 % din lotul M.

Concluzii

Studiul de față a subliniat rezoluția sistemică a infecției parodontale prin demonstrarea unor corelații semnificative între valorile markerului inflamator hsCRP și parametrii parodontali, în rândul pacienților cu boală parodontală.

Terapia parodontală aplicată a fost urmată de un răspuns adecvat din partea organismului gazdă, cu o îmbunătățire semnificativă a stării de sănătate parodontală asociată cu reducerea inflamației sistemice.

Studiul 2. Validarea unui protocol experimental de inducere a patologiei parodontale pe model animal

Introducere/Obiective

Modelele animale au un rol important în generarea de noi cunoștințe în domeniul științelor medicale, inclusiv parodontologia și au ca avantaj posibilitatea reproducerii *in vivo* a caracteristicilor celulare și a reacțiilor care apar la specia umană. Obiectivul acestui studiu a fost elaborarea și validarea unui model experimental original și reproductibil pentru inducerea bolii parodontale la șobolanul Wistar, care să permită ulterior studiul implicațiilor sistemice ale patologiei parodontale precum și eficiența unor noi metode terapeutice locale și generale.

Material și metodă

Studiul a inclus 10 șobolani masculi, rasa Wistar cu vârsta 6-8 săptămâni și greutate 150-200g. Intervenția de inducere a parodontitei s-a realizat în condiții de anestezie generală, prin aplicarea de ligaturi în "8" cu fir de mătase neresorbabil nr.4/0 la nivelul incisivilor inferiori, modificând protocolul de inducere a patologiei parodontale cel mai frecvent utilizat în literatură, care presupune plasarea ligaturilor la nivelul molarilor. Ligaturile au fost astfel menținute 7 și respectiv 14 zile. La finalul experimentului animalele au fost sacrificate iar probele reprezentând extremitatea cefalică au fost pregătite pentru prelucrare histologică.

Rezultate

La examenul clinic s-a constatat prezența manifestărilor inflamatorii gingivale asociate cu o marcată mobilitate dentară. Aceste leziuni au fost determinate de prezența firului de mătase aplicat în jurul grupului frontal inferior acționând ca un factor retentiv pentru placa bacteriană și stimulând declanșarea unui răspuns al organismului gazdă. Analiza histopatologică a demonstrat prezența unui infiltrat inflamator neutrofilic și mononuclear și o creștere a numărului de osteoclaste, determinând procese rezorbtive la nivelul osului alveolar.

Concluzii

În studiul nostru am demonstrat prin examinări clinice și analize histopatologice că acest model experimental modificat prin plasarea ligaturilor la nivelul incisivilor prezintă o serie de avantaje: o perioadă scurtă de timp necesară instalării patologiei parodontale (7/14 zile), inducerea unei inflamații pronunțate a țesuturilor parodontale și o rezorbție avansată a osului alveolar cu simplificarea procedurilor prin creșterea accesibilității la zonele interesate și reducerea traumei animalelor experimentale.

Studiul 3- Evaluarea răspunsului inflamator sistemic în boala parodontală indusă experimental

Introducere/Obiective

Scopul acestui studiu a fost investigarea asocierii manifestărilor anatomo-clinice specifice patologiei parodontale cu răspunsul inflamator sistemic, pe un model experimental original de parodontită indusă la șobolanul Wistar.

Material și metodă

Studiul a inclus 40 de șobolani, rasa Wistar cărora le-a fost indusă patologia parodontală după protocolul experimental descris anterior. Modificările clinice ale structurilor parodontale, au fost urmărite zilnic, pe perioada inducerii și instalării patologiei parodontale. S-au prelevat probe de sânge de 1,5-2 ml, de la fiecare subiect înainte de aplicarea ligaturilor (T1) și la 7 zile de la inducerea patologiei. Analizele de laborator au vizat evaluarea următorilor parametri imunologici și hematologici: IL-6, numărul total de leucocite, neutrofile, monocite, limfocite, eozinofile, bazofile și trombocite.

Rezultate

Manifestările clinice care au fost detectate la șobolani privind culoarea, conturul și consistența țesutului gingival însoțite de sângerarea la palpare și de mobilitate dentară accentuată sunt similare

semnelor clinice de parodontită identificate la om. Un rezultat relevant al acestui studiu este reprezentat de creșterea semnificativă a nivelului interleukinei-6 (IL-6) în cursul instalării bolii parodontale la șobolani, detectată prin investigații imunologice. Am observat o creștere semnificativă statistic a numărului de neutrofile ($p=0,003$) și a valorii medii a trombocitelor ($p=0,001$) asociate cu instalarea leziunilor parodontale.

Concluzii

Rezultatele studiului nostru evidențiază implicațiile sistemice ale parodontitei, demonstrând că modificările anatomo-clinice surprinse la nivelul parodonțiului la șobolani au fost corelate cu un notabil răspuns inflamator sistemic.

Studiul 4- Evaluarea efectului pleiotropic local și sistemic al statinelor și al metforminei în terapia parodontală- studiu pe model animal

Introducere/Obiective

Cercetările ultimilor ani au urmărit identificarea de noi soluții terapeutice în domeniul terapiei regenerative parodontale. Având în vedere prevalența crescută a patologiei parodontale asociată tulburărilor cardiovasculare și metabolice la populația adultă, utilizarea curentă a substanțelor prescrise pentru tratamentul acestor din urmă afecțiuni ar putea îmbunătăți starea de sănătate orală, respectiv parodontală a pacienților. În acest context, în studiul de față ne-am propus evaluarea efectelor pleiotropice ale simvastatinei și ale metforminei, în boala parodontală indusă experimental.

Material și metodă

Studiul a inclus 35 de șobolani masculi rasa Wistar, cu boală parodontală indusă experimental conform protocolului descris. După instalarea leziunilor parodontale subiecții au fost distribuiți în 6 loturi distincte, în funcție de tratamentul care le-a fost aplicat și un lot control, care nu a urmat tratament. Preparatele utilizate pentru tratamentul topic, reprezentate de geluri parodontale mucoadezive pe bază de simvastatină 2%, și respectiv metformină 2% au fost folosite pentru prima dată în această formulare. Simvastatina și metformina au fost administrate și prin gavaj intragastric la unii subiecți. Tratamentele au fost aplicate zilnic, timp de 7 zile. S-au recoltat probe de sânge de la fiecare animal înainte și după aplicarea tratamentului experimental. La sfârșitul perioadei experimentale, animalele au fost sacrificate, în vederea analizei histopatologice pentru evaluarea efectelor tratamentelor instituite. Rezultatele histopatologice au fost exemplificate prin histologie descriptivă și cuantificate printr-un scor histologic propus de autori, care a permis analiza statistică a acestora.

Rezultate

Examenul clinic a evidențiat o îmbunătățire semnificativă a statusului parodontal al subiecților tratați cu simvastatină, respectiv metformină comparativ cu lotul martor, cu reducerea semnificativă a fenomenelor inflamatorii parodontale, exprimate prin sângerare la sondare și mobilitate dentară. Analiza histopatologică a relevat că administrarea topică și sistemică a substanțelor amintite a determinat reducerea infiltratului inflamator și a fenomenelor resorbitive de la nivelul osului alveolar, precum și inițierea proceselor regenerative osoase, relevate prin aspectele caracteristice de proliferare osteocondrală. Un element original al cercetării de față este reprezentat de scorul histologic conceput pentru a cuantifica răspunsul inflamator și procesul de remodelare osoasă în boala parodontală experimentală la șobolan. Scorul histologic utilizat, este reproductibil și ușor de aplicat și se bazează pe înregistrarea și codificarea următorilor parametri: inflamația, țesutul de granulație, vasele de neoformație, fibroblastele, osteoblastele, osteoclastele, formarea și rezorbția osoasă. Tratamentele cu simvastatina, cât și cele cu metformina au determinat un răspuns sistemic favorabil al organelor, prin reducerea inflamației sistemice evidențiată de scăderi ale valorilor markerului inflamator IL-6, precum și ale parametrilor hematologici precum leucocite, neutrofile și trombocite.

Concluzii

Rezultatele acestui studiu au demonstrat efectul pleiotropic antiinflamator local și sistemic al produselor pe bază de simvastatină și metformină. Preparatele mucoadezive parodontale, folosite pentru prima dată în această formulare au fost eficiente în inițierea proceselor de regenerare a osului alveolar, în boala parodontală indusă experimental. Prin urmare, datele noastre sugerează că simvastatina, respectiv metformina reprezintă alternative terapeutice eficiente care reduc riscul sistemic asociat parodontitei pe lângă reducerea inflamației locale și recuperarea țesutului osos.

Studiul 5- Cercetări privind eficiența utilizării celulelor stem foliculare în terapia parodontală –studiu experimental

Introducere/Obiective

Evidențe recente din literatură au sugerat noi oportunități privind terapia regenerativă parodontală rezultate din extinderea cunoștințelor în sfera ingineriei tisulare. Obiectivul studiului nostru a fost evaluarea potențialului de regenerare parodontală al celulelor stem foliculare, pe un model experimental de parodontită la șobolanul Wistar.

Material și metodă

Studiul pilot a inclus șobolani masculi rasa Wistar, cu leziuni parodontale induse experimental. Subiecților din lotul tratat le-a fost aplicat un tratament local prin injectare a unui gel pe bază de celule stem foliculare pe soluție de fibrinogen iar cei din lotul martor nu au urmat nici o formulă de tratament. Celulele stem au fost izolate de la nivelul sacului folicular al unui canin maxilar în incluziei totală și au fost apoi caracterizate fenotipic prin imuncitochimie, flowcitometrie și analiză RT-PCR, pentru expresia markerilor de celule stem. S-au recoltat probe de sânge, înainte și după tratament, a fost efectuat zilnic examenul clinic al subiecților și la finalul experimentului s-a realizat examenul histopatologic.

Rezultate

Am constatat o îmbunătățire semnificativă a statutului parodontal al subiecților în urma tratamentului, cu reducerea semnificativă a fenomenelor inflamatorii locale. Analiza histopatologică a evidențiat fenomene de proliferare osteocondrală și reducerea infiltratului inflamator la subiecții tratați comparativ cu lotul martor. Determinările imunologice și hematologice au identificat scăderi ale valorilor medii ale IL-6, limfocite și trombocite în urma tratamentului cu celule stem foliculare.

Concluzii

Rezultatele studiului sugerează că celulele stem foliculare reprezintă o sursă generoasă de celule pentru ingineria tisulară, cu aplicabilitate în terapia regenerativă parodontală.

Studiul 6- Analiza relației dintre boala parodontală și patologia cardiovasculară-studiu epidemiologic observațional

Introducere/Obiective

Obiectivul acestui studiu epidemiologic a fost evaluarea relației dintre boala parodontală și afecțiunile cardiovasculare prin identificarea corelațiilor existente și a factorilor de risc, la un grup populațional din nord-vestul României, prin intermediul unui chestionar conceput și validat în acest scop.

Material și metodă

Chestionarul conceput și validat prin teste specifice (metoda test/retest- determinarea coeficientului Cronbach alpha și a coeficientului de concordanță Cohen κ) a fost aplicat sub formă de interviu structurat la adulți cu vârsta peste 45 ani din județele Cluj și Bihor. Selecția participanților la studiu s-a bazat pe metoda de eșantionare non-probabilistică – selecție consecutivă. Datele au fost analizate statistic utilizând aplicația SPSS (versiunea 17.0 pentru Windows) și aplicația Microsoft Excel.

Rezultate

Media de vârstă a participanților a fost 55.74 ± 10.51 cu o distribuție echilibrată privind genul acestora și mediul de proveniență. Un procent de 58,3% din totalul de 108 participanți incluși în studiu au declarat un diagnostic cunoscut de boală parodontală (BP+). Dintre aceștia, 93,5% au raportat un istoric familial cunoscut de parodontită. Au fost observate diferențe semnificative statistic între pacienții cu boală parodontală și cei fără acest diagnostic, în ceea ce privește prezența edentațiilor ($p=0,015$) și fumatul ($p=0,04$). Afecțiunile cardiovasculare au fost declarate de către 38,1% dintre pacienții cu parodontită și diabetul a fost raportat de către 36,5% dintre aceștia. Am observat o incidență scăzută a afecțiunilor parodontale și cardiovasculare la pacienții care au declarat un stil de viață sănătos privind alimentația și activitatea fizică. Analiza de regresie multivariată a identificat parodontita ca variabilă predictivă independentă pentru boala coronariană aterosclerotică (OR=4,85, 95% CI 1,01-23,29, $p=0,049$).

Concluzii

Studiul nostru a constatat o asociere semnificativă statistic între boala parodontală, fumatul și istoricul familial de parodontită. Ca factori de protecție pentru parodontită au fost identificați consumul zilnic de fructe proaspete și creșterea frecvenței activității fizice. Cu toate că boala parodontală a fost evidențiată ca un factor de risc pentru afecțiunile cardiovasculare aterosclerotice sunt necesare cercetări suplimentare pentru a fundamenta asocierea parodontitei cu patologia cardiovasculară.

ORIGINALITATEA ȘI CONTRIBUȚIILE INOVATIVE ALE TEZEI

Cercetările realizate în prezenta teză de doctorat conțin elemente care îi conferă un caracter original și inovativ, prin abordarea multidisciplinară a unor aspecte legate de starea de sănătate orală.

Cu scopul de a evalua riscul pacienților cu boală parodontală de a dezvolta afecțiuni cardiovasculare, prin intermediul markerilor surogat și având în vedere că vârsta înaintată este considerată un factor de risc cardiovascular considerăm că includerea în studiul nostru a unor adulți tineri, sănătoși sistemic, fără alți factori de risc detectabili, oferă o perspectivă utilă privind studiul relației dintre condițiile inflamatorii locale și sistemice. Relevanța clinică a acestei asocieri, cu repercusiuni asupra calității vieții individului ne determină să subliniem necesitatea unui control adecvat al bolii parodontale, ca deziderat de urmat în practica curentă, în medicina dentară. După cunoștințele noastre, acesta este primul studiu care evaluează corelațiile dintre severitatea bolii parodontale și valorile hsCRP, precum și eficiența tratamentului parodontal în reducerea riscului cardiovascular, condus pe un eșantion populațional cu adulți tineri, sănătoși sistemic din România.

Modelul experimental propus pentru inducerea patologiei parodontale asemănătoare patologiei umane, la animalele de experiență este unul original și reproductibil. În studiul nostru am demonstrat prin examinări clinice și analize histopatologice că acest model experimental modificat prin plasarea ligaturilor la nivelul incisivilor și nu la nivelul molarilor (cel mai frecvent adoptat în literatură) prezintă o serie de avantaje: o perioadă scurtă de timp necesară instalării patologiei parodontale-7/14 zile, inducerea unei inflamații pronunțate a țesuturilor parodontale și o rezorbție avansată a osului alveolar, facilitarea intervențiilor terapeutice zilnice, prin accesibilitatea crescută asupra zonei interesate cu simplificarea procedurilor operatorii și reducerea traumei animalelor experimentale.

Prin demonstrarea efectelor pleiotropice ale simvastatinei și metforminei în boala parodontală experimentală, studiile din cadrul tezei de doctorat contribuie la extinderea cunoștințelor legate de efectele benefice ale acestor substanțe medicamentoase. Nu am identificat preocupări naționale în ceea ce privește evaluarea efectelor pleiotropice antiinflamatorii ale substanțelor amintite anterior în boala parodontală, fapt ce conferă prezentei teze de doctorat un alt aspect de originalitate.

Preparatele mucoadezive parodontale, folosite pentru prima dată în această formulare au fost eficiente în inițierea proceselor de regenerare a osului alveolar, în boala parodontală indusă experimental. Astfel, acest sistem de eliberare a substanței active poate fi promițător pentru aplicare topică în terapia parodontală. Prin urmare, extrapolând rezultatele acestui studiu putem susține că tratamentul cu statine și metformină administrat în terapia unor disfuncții metabolice ar putea fi eficient în îmbunătățirea statusului parodontal la pacienții cu parodontită asociată cu afecțiuni sistemice precum bolile cardiovasculare și sindromul metabolic.

Chestionarul pe care l-am conceput și validat cu scopul de a evalua relația bidirecțională dintre boala parodontală și afecțiunile cardiovasculare, precum și factorii de risc ai acestor patologii reprezintă un element original al cercetării de față. Rezultatele obținute încurajează la continuarea cercetărilor utilizând chestionarul elaborat, în studii transversale extinse, ca un instrument care permite analiza legăturii dintre patologii amintite și identificarea precoce a factorilor de risc ai acestora. Astfel, dacă această implicare sistemică a parodontitei va fi fundamentată și clarificată, devine disponibilă o abordare holistică nouă a controlului afecțiunilor cardiovasculare, cu includerea tratamentului parodontal ca o măsură preventivă independentă în practica medicală curentă.

În concluzie, rezultatele cercetărilor noastre deschid noi perspective în abordarea pluridisciplinară a bolii parodontale și în aplicarea de noi modalități terapeutice eficiente, cu impact semnificativ asupra stării generale de sănătate. Având în vedere prevalența crescută a parodontitei, ca problemă de sănătate publică, subliniem responsabilitatea medicului dentist în gestionarea corespunzătoare a pacienților cu boală parodontală, pentru prevenția primară a tulburărilor sistemice legate de starea de sănătate orală.

SUMMARY OF THE Ph.D. THESIS

**Markers of systemic bacterial exposure in
periodontal disease and cardiovascular disease risk**

Ph.D. Student: **Anca Ionel**

Ph.D. Scientific Coordinator: **Prof. Dr. Radu Septimiu Câmpian**

CLUJ-NAPOCA 2016



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚEGANU
CLUJ-NAPOCA

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION	1
CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	
1. Clinical and etiopathogenetic aspects in periodontal disease	5
1.1. Clinical forms of the periodontal disease. Classification	5
1.2. The etiopathogenesis of the periodontal disease	6
1.2.1. The microbial determining factor in the etiology of the periodontal disease	6
1.2.2. Local favoring factors	7
1.2.3. General favoring factors	7
1.2.4. Pathogenetic mechanisms of the evolution of the periodontal disease	8
1.2.4.1. Direct pathogenetic mechanisms	8
1.2.4.2. Indirect pathogenetic mechanisms	9
2. Systemic inflammatory markers involved in periodontal disease	11
2.1. The host organism immunomodulatory response and the relevance of the inflammatory markers	11
2.1.1. The C-reactive protein	12
2.1.2. The fibrinogen	14
2.1.3. Proinflammatory cytokines	14
2.1.3.1. Interleukins	14
2.1.3.2. Tumor necrosis factor alpha	16
2.1.3.3. Chemokines	16
2.1.4. Matrix metalloproteinases	17
2.2. Methods used in determining inflammatory markers in periodontal disease	17
3. Current data regarding the association of the periodontal disease with systemic diseases	19
3.1. Current concepts regarding the causal relationship between periodontitis and cardiovascular diseases	19
3.1.1. The implications of the periodontitis in the etiopathogenesis of atherosclerosis	20
3.1.2. Systemic inflammatory mediators associated with periodontal disease and cardiovascular pathology	20
3.2. The relationship between periodontal disease and diabetes Mellitus	21
3.3. The relationship between periodontal disease and metabolic syndrome	21
4. Therapeutic approaches in periodontal disease	23
4.1. General therapeutic algorithm- conventional periodontal treatment	23
4.2. Adjuvant pharmaceutical therapy in periodontitis	24
4.3. Systemic implications of the periodontal treatment	25
4.4. The role of tissue engineering in periodontal disease	25
PERSONAL CONTRIBUTION	
1. Working hypothesis/objectives	29
2. General methodology	31
2.1. Methodology for clinical research	31
2.2. Methodology for experimental research	34
2.3. Methodology for the prevalence epidemiological study	40
3. Study 1 – Researches on the correlation between periodontal disease and systemic inflammatory markers	43
3.1. Introduction	43
3.2. Working hypothesis/objectives	44
3.3. Material and method	44
3.4. Results	46

3.5. Discussions	51
3.6. Conclusions	54
4. Study 2 – Validation of an experimental protocol for induction the periodontal pathology in animal model	55
4.1. Introduction	55
4.2. Working hypothesis/objectives	56
4.3. Material and method	56
4.4. Results	58
4.5. Discussions	62
4.6. Conclusions	64
5. Study 3- Evaluation of the systemic inflammatory response in experimentally induced periodontitis	65
5.1. Introduction	65
5.2. Working hypothesis/objectives	66
5.3. Material and method	66
5.4. Results	67
5.5. Discussions	69
5.6. Conclusions	71
6. Study 4- Assessment of the local and systemic pleiotropic effects of statins and metformin in the periodontal therapy- study on animal model	73
6.1. Introduction	73
6.2. Working hypothesis/objectives	75
6.3. Material and method	76
6.4. Results	79
6.5. Discussions	99
6.6. Conclusions	105
7. Study 5- Researches on the effectiveness of using follicular stem cells in periodontal therapy- experimental study	107
7.1. Introduction	107
7.2. Working hypothesis/objectives	108
7.3. Material and method	108
7.4. Results	110
7.5. Discussions	115
7.6. Conclusions	117
8. Study 6- Analysis of the relationship between periodontal disease and cardiovascular pathology- an observational epidemiological study	119
8.1. Introduction	119
8.2. Working hypothesis/objectives	120
8.3. Material and method	120
8.4. Results	121
8.5. Discussions	128
8.6. Conclusions	130
9. General conclusions	131
10. Originality and innovative contributions of the thesis	133
REFERENCES	135
ANNEXES	152

Keywords: periodontal disease, systemic inflammatory markers, hsCRP, IL-6, cardiovascular diseases, statins, experimental animal model, periodontal therapy

INTRODUCTION

Periodontal disease and cardiovascular disorders register a high prevalence among the population, and a dimension of their relationship could have an impact on many individuals. The knowledge of complex aspects concerning the pathogenesis, the evolution and the treatment of the periodontitis becomes a topic of considerable interest due to the systemic implications of this disease, even more as periodontitis is currently considered an independent risk factor for cardiovascular and cerebrovascular disorders.

The causal relationship between periodontitis and systemic diseases is supported by the premise according to which the involvement of the systemic response to the aggression of the periodontal pathogens causes changes in the dynamics of inflammatory mediators, favoring the mechanisms of atherosclerosis and its coronary complications. Therefore, the systemic inflammatory markers become useful tools in the identification of the systemic resolution of the inflammatory periodontal processes.

The recent research incorporates the concept of “periodontal medicine” in clinical practice and highlights the importance of substantiation the current knowledge regarding the systemic implications of the periodontitis and the need for an appropriate management of the patients, to improve their quality of life and to prevent the possible complications. The overall objective of this thesis was to obtain new information regarding the systemic expression of the periodontal pathology and testing of various innovative therapeutic modalities with impact on periodontal status and general health of the patients.

CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

In the four chapters of the theoretical research of this thesis are reviewed novel aspects related to clinical forms and etiopathogenetic mechanisms of the periodontal disease, systemic inflammatory markers involved in the periodontal pathology, the association between periodontitis and cardiovascular diseases and several periodontal therapeutic approaches.

PERSONAL CONTRIBUTION

The personal contribution section includes the studies conducted in the doctoral research, and their description is preceded by the exposure of the working hypothesis, objectives, and general methodology.

Working Hypothesis/Objectives

The present work starts from the premise that local specific periodontal infection can disrupt the level of the systemic inflammatory markers, thus promoting the mechanisms of atherosclerosis and its complications. The recent evidence suggests that patients with periodontitis are at increased for developing cardiovascular disorders, in an independent manner of other behavioral or medically known risk factors and can be correlated with the severity of the periodontal disease. In recent years, there have been attempts to identify new therapeutic options targeting bone loss prevention and inhibition of proinflammatory cytokines, with positive effects on periodontal status and general health. Statins and metformin, substances widely used in the treatment of some metabolic disorders have acquired a potential role in the regenerative periodontal therapy, favoring the increasing of the bone density and remodeling of the supportive periodontal tissues. Stem cells and tissue engineering techniques have gained interest in scientific research in periodontology.

In the light of the previously exposed context, this doctoral thesis is based on conducting a clinical study, of experimental researches and of an epidemiological “cross-sectional” study and has representative objectives for the theme of interest.

The clinical study aims:

- Evaluation of the relationship between serum levels of high-sensitive C-reactive protein (hsCRP), as a cardiovascular risk inflammatory marker and the presence of the periodontal disease; analyzing the body’s systemic response to conventional periodontal treatment by measuring of inflammatory markers and lipid profiles before and after the applied therapy

The experimental studies have focused on the following aspects:

- Validation of an original and reproducible experimental model for periodontal disease in Wistar rats, similar to human pathology;
- Assessment of the dynamics of hematological and immunological markers by performing specific determinations during the periodontal pathology induction;
- Evaluation of the pleiotropic local and systemic effect of simvastatin and metformin, used as adjuvant preparations for conventional periodontal therapy, on the experimental model of induced periodontitis in Wistar rats;
- Assessment of the effectiveness of treatment with follicle stem cells, on the experimental model of induced periodontitis.

The epidemiological observational study aims:

- Investigating the prevalence of the systemic disorders in periodontitis patients, analyzing the common risk factors of these diseases and the possible causal relationship between the mentioned pathologies through a questionnaire designed and validated for this purpose.

We mention that studies have been conducted with the agreement of the Ethics Committee of the "Iuliu Hatieganu" University of Medicine and Pharmacy, in accordance with current legislation on clinical and experimental research ethics.

Study 1 – Researches on the correlation between periodontal disease and systemic inflammatory markers

Introduction/Objectives

Given the occurrence of the periodontal disease and cardiovascular pathology at younger and younger ages in recent years, the aim of this study was to investigate whether circulating levels of high-sensitive C-reactive protein (hsCRP-inflammatory cardiovascular marker) can be influenced by the periodontal therapy, in patients with periodontitis and without detectable systemic diseases. We also proposed to identify the correlations between the specific periodontal parameters and hsCRP values. Another objective of the present study was to include healthy systemic young adults with periodontitis, in order to estimate their risk of developing cardiovascular disorders, based on serum hsCRP values.

Material and method

Systemically healthy young adults (18-45 years of age) were distributed into two groups, according to their periodontal diagnostic: the case group (C;n=12) included patients with periodontitis and the control group (M;n=14) represented by healthy periodontal patients. Periodontal parameters (periodontal index-Russel, plaque index-IP, gingival bleeding index-GBI, probing depth-PD) and systemic levels of biomarkers such as hsCRP, total cholesterol, HDL and blood glucose were assessed at baseline and two weeks, and two months control period. Patients from the control group (M) did not require periodontal treatment; which was applied only to the case group participants (C). The periodontal treatment protocol consisted in motivation to oral hygiene maintaining, scaling and root planing (SRP) and removing the periodontal pockets content, creating the favorable local conditions for periodontal healing. The statistical analysis was performed using the SPSS 17.0 (Windows version), Statistica 8.0 and Microsoft Excel application.

Results

The hsCRP values, at baseline, were significantly increased in patients with periodontitis compared with the control ones ($p=0,003$). Statistically, significant differences were observed between groups regarding baseline periodontal indices: PI, GBI, IP, and PD ($p<0,001$). We also found a significantly positive correlation between hsCRP initial values and probing depth ($r=0,47$; $p=0,01$) and periodontal index ($r=0,41$; $p=0,03$). At follow-up visits, we found that hsCRP level was reduced after periodontal therapy, but without statistical difference compared with baseline ($p=0,10$; $p=0,07$). The treatment performed resulted in a significant improvement in all periodontal parameters ($p<0,001$). Statistically significant differences were found between patients from study groups regarding their distribution in cardiovascular risk categories, depending on hsCRP values ($p=0,03$). Thus, 71,43% of patients from group M correspond to the low-risk category (hsCRP<1mg/L) compared to 25% of patients from case group. A percentage of 25% from group C are categorized as high risk (hsCRP>3mg/L) versus 0% from group M.

Conclusions

In summary, this study highlighted the systemic resolution of the periodontal infection by demonstrating significant correlations between inflammatory markers hsCRP and periodontal parameters, among patients with periodontitis.

The applied periodontal therapy was followed by a proper response from the host organism, with a significant improvement of the periodontal health condition accompanied by the reduction of the systemic inflammation.

Study 2 – Validation of an experimental protocol for induction the periodontal pathology in animal model

Introduction/Objectives

Animal models have an important role in the generation of new knowledge in medical sciences, including periodontology and have the advantage of the opportunity to reproduce *in vivo* the cellular characteristics and reactions that occur in humans. The objective of this study was the development and the validation of an original and reproducible experimental model for inducing periodontal disease in Wistar rats, allowing further the study of the systemic implications of the periodontal pathology and the effectiveness of new local and general therapeutic methods.

Material and method

Ten Wistar rats with an average age of 6-8 weeks and an average weight of 150-200g were included in this study. The intervention of periodontitis induction was performed under general anesthesia by applying ligatures in “8” with 4/0 non-resorbable sterile silk thread around the lower incisors, changing the most commonly used periodontitis induction protocol, which involved the placing of ligatures around the molars. Ligatures were maintained 7, respectively 14 days. On completion of the experiment the animals were sacrificed and samples representing the cephalic extremity were prepared for histological processing.

Results

Clinically, we observed inflammatory gingival signs associated with a marked dental mobility. These injuries were caused by the presence of the silk thread applied around the lower frontal group, acting as a retentive factor for the plaque and triggering the host's organism response. The histopathological analysis showed the presence of the mononuclear and neutrophilic inflammatory infiltrate and an increase in the osteoclast number, causing the alveolar bone resorption process.

Conclusions

In our study, we demonstrated by clinical and histopathological analysis that this modified “ligature” experimental model of periodontitis in rats has several advantages: short-time of induction of the periodontal pathology (7/14 days), induction of a pronounced inflammation of the periodontal tissues and an advanced alveolar bone resorption. These results were obtained simplifying the procedures by increasing the accessibility to the affected areas and reducing the operative trauma of the subjects.

Study 3- Evaluation of the systemic inflammatory response in experimentally induced periodontitis

Introduction/Objectives

The purpose of this study was to assess the correlation between the specific clinical changes of the periodontium with the systemic inflammatory response, in an experimental model of periodontitis in rats.

Material and method

Experiments were performed on 40 male Wistar rats-6 weeks of age, weighing 150-200 g, which were subjected of induced periodontal pathology after the experimental protocol previously described. Clinically, we daily assessed the structural changes of the periodontal tissue consecutive of the periodontal disease progression. Two blood samples of 1,5-2 ml were obtained from each subject, before applying the ligatures (T1) and seven days after the induction of the periodontal pathology (T2). Haematological analysis assessed the following hematological and immunological parameters: IL-6, total leukocytes, neutrophils, lymphocytes, monocytes, eosinophils, basophils, and platelets.

Results

The clinical manifestations that were detected in rats regarding the color, the contour and the consistency of the gingival tissues accompanied by bleeding on probing and increased tooth mobility are similar signs of periodontitis identified in humans. An important finding of this study is the significant

increase in values of the inflammatory marker interleukin-6 (IL-6) during the progression of periodontitis in rats, detected by immunological investigations. We observed a statistically significant increase in the neutrophils ($p=0,003$) and the mean platelet count ($p=0,001$), associated with the installation of the periodontal lesions.

Conclusions

In summary, the results of this research highlight the systemic implications of the periodontitis, demonstrating that clinical changes of the rat's periodontium were correlated with a notable systemic inflammatory response.

Study 4- Assessment of the local and systemic pleiotropic effects of statins and metformin in the periodontal therapy- study on animal model

Introduction/Objectives

Researchers in recent years have sought to identify new therapeutic approaches in regenerative periodontal therapy. Given the increased prevalence of the periodontal pathology associated with metabolic and cardiovascular disorders in the adult population, current use of substances prescribed to treat these general disorders could improve the oral health of the periodontal patients. In this context, the present study aimed the assessment of the pleiotropic effects of simvastatin and metformin in experimentally induced periodontal disease.

Material and method

The study included 35 male Wistar rats with experimentally induced periodontal disease according to the described protocol. After installing the periodontal lesions, the subjects were distributed into six distinct groups, according to the treatment that was applied and a control group that did not follow the treatment. The preparations used for the topical therapy, represented by the mucoadhesive gels based on simvastatin 2%, respectively metformin 2% were used for the first time in this formulation. Simvastatin and metformin were administered by intragastric gavage in some subjects. The treatments were applied daily, for seven days. Two blood samples were obtained for each animal before and after applying the experimental treatment. On completion of the experiment, the animals were sacrificed to evaluate the effects of the administered treatments by histopathological analysis. The results were therefore exemplified by descriptive histology and quantified by a histological score proposed by the authors, that allowed their statistical analysis.

Results

The clinical examination highlighted a significant improvement in the periodontal status of the subjects treated with simvastatin or metformin compared with controls, with a significant reduction of the inflammatory periodontal phenomena expressed by bleeding on probing and tooth mobility. The histopathological analysis revealed that topical and systemic administration of the mentioned substances had reduced the inflammatory infiltration and the alveolar bone resorption, as well as the initiation of the bone regenerative processes, exemplified by the characteristic aspects of osteochondral proliferation. An original element of the present work is also the histological score designed to quantify the inflammatory response and the bone remodeling process in experimental periodontal disease in rats. This score is based on the histological record of the following parameters: inflammation process, granulation tissue, gingival hyperplasia, neo-formation of blood vessels, fibroblasts, osteoblasts, bone formation, osteoclasts, and bone resorption. The treatments with simvastatin and those with metformin induced a favorable systemic response of the organism by reducing the systemic inflammation evidenced by decreases in values of serum inflammatory marker IL-6 and hematological parameters such as leukocytes, neutrophils, and platelets.

Conclusions

This study demonstrated the pleiotropic local and systemic anti-inflammatory effects of simvastatin and metformin based products. The mucoadhesive periodontal preparations, used for the first time in this formulation were effective on alveolar bone healing after ligature - induced periodontitis in rats. Therefore, our data suggest that simvastatin, respectively metformin may be an efficient anti-inflammatory therapeutic alternative that reduces systemic risk associated with periodontitis, besides the reduction of local inflammation and recovery of the alveolar bone loss.

Study 5- Researches on the effectiveness of using follicular stem cells in periodontal therapy- experimental study

Introduction/Objectives

Recent evidence from the literature has suggested new opportunities regarding the regenerative periodontal therapy resulting from the expansion of knowledge in the field of tissue engineering. The goal of this experiment was the assessing of the periodontal regenerative potential of the follicular stem cells, in an experimental model of periodontitis in Wistar rats.

Material and method

This pilot study included male Wistar rats with experimentally induced periodontal lesions. In subjects from treated group was applied a local treatment by injection of follicular stem cells- based gel on fibrinogen solution while those from the control group did not follow any treatment formula. The stem cells were isolated from an impacted upper canine and then were characterized by immunocytochemical staining, flow cytometry analysis and RT-PCR analysis for stem cells gene expression. There were collected two blood samples from each subject, before and after treatment, it was daily conducted the clinical examination and at the end of the experiment was performed the histopathological examination.

Results

We found a significant improvement in the periodontal status of the subjects following the treatment with a significant decrease of the local inflammatory signs. The histopathological analysis revealed the osteochondral proliferation processes and the reduction of the inflammatory infiltrate in the treated subjects compared with controls. Immunological and hematological assays identified decreases in the average values of the IL-6 marker, lymphocytes, and platelets consecutive of the treatment with follicular stem cells.

Conclusions

Therefore, these data suggest that follicular stem cells are a valuable cell source for tissue engineering, with application in the regenerative periodontal therapy.

Study 6- Analysis of the relationship between periodontal disease and cardiovascular pathology- an observational epidemiological study

Introduction/Objectives

The aim of this epidemiological study was to assess the relationship between periodontitis and cardiovascular diseases by identifying the correlation and their risk factors in a population group from northwestern Romania, using a questionnaire designed and validated for this purpose.

Material and method

The designed questionnaire was validated using specific tests (test –retest reliability method/Cronbach's alpha and Cohen's Kappa coefficient determination) and was applied as a structured interview in adults over 45 years from the Cluj and Bihor counties. Study participants were included by non-probability sampling, consecutive selection. Data obtained from the questionnaires were statistically analyzed using SPSS Statistic for Windows, Version 17.0 and Microsoft Excel Application.

Results

The average age of the participants was 55.74 ± 10.51 with a balanced distribution regarding their gender and residency. A percentage of 58,3% of the total 108 study participants reported a previous diagnosis of periodontal disease (BP+). Of these, 93,5% declared a known family history of periodontitis. Statistically, significant differences were observed between patients with and those without periodontal disease diagnosis, regarding the edentulism ($p=0,015$) and smoking ($p=0,04$). Cardiovascular diseases were declared by 38.1% of participants with periodontitis while diabetes was reported by 36.5% of subjects from the BP+ group. Multivariate analyses suggested periodontitis as a predictive variable for atherosclerotic coronary artery disease with an OR of 4.85 (95% confidence interval 1.01–23.29, $p=0.049$)

Conclusions

Our study found a statistically significant association between periodontal disease and a known family history of periodontal disorders and smoking duration. Daily intake of fresh fruits and increased sports activities were found to be protective factors for periodontal disease. Although the periodontal disease was highlighted as an independent risk factor for atherosclerotic cardiovascular diseases, further research is needed to substantiate the association of these pathological conditions.

Originality and innovative contributions of the thesis

The research conducted in this doctoral thesis contains several elements which give an original and innovative character, by the multidisciplinary approach of aspects related to oral health.

In order to assess the periodontitis patient's risk to develop cardiovascular disorders through surrogate markers and given that old age is a recognized cardiovascular risk factor, we consider that the inclusion of young, systemically healthy adults in our study, without other detectable risk factors provides a useful perspective on the relationship between local and systemic inflammatory conditions. The clinical relevance of this association, with repercussions on individual's quality of life, leads us to emphasize the importance of adequate control of periodontitis, as a goal to follow in current dental practice. To our knowledge, this is the first study assessing the correlations between the severity of periodontal disease and hsCRP values, and the efficacy of the periodontal treatment in reducing the cardiovascular risk, conducted on a Romanian young, systemic healthy population sample.

The proposed experimental model to induce periodontal pathology, similar to human periodontitis, is original and reproducible. We demonstrated by clinical and histopathological examination that this "ligature model" modified by placing the ligatures around the lower incisor instead of molars (the most commonly adopted in literature), presents several advantages: a short period of time required for installation of the periodontal pathology (7/14 days), inducing a pronounced periodontal tissues inflammation and an advanced alveolar bone resorption, facilitating daily therapeutic interventions through increasing the accessibility to the interested areas, by simplifying the operative procedures and reducing the trauma of the experimental animals.

By demonstrating the pleiotropic effects of simvastatin and metformin in experimental periodontal disease, studies of this thesis contribute to expanding knowledge about the beneficial consequences of these drugs. We did not identify national interests regarding the assessment of the pleiotropic anti-inflammatory effects of the substances mentioned above in periodontal disease, which gives this thesis another aspect of originality.

Periodontal mucoadhesive formulations, used for the first time in this formulation were efficient for initiating the alveolar bone regenerative process, in experimentally induced periodontitis. Thus, this drug delivery system may be promising for topical application in periodontal therapy. Therefore, extrapolating the results of this study, we can state that statin and metformin therapy, administrated for the treatment of some metabolic dysfunctions may be effective for improving the periodontal status in patients with periodontitis associated with systemic disorders such as cardiovascular disease and metabolic syndrome.

The questionnaire that we designed and validated to assess the bidirectional relationship between periodontitis and cardiovascular pathology and risk factors for these diseases is an original element of the present research. The obtained results encourage further research using this questionnaire, in extensive cross-sectional studies, as a tool for analyzing the link between pathologies mentioned above and the early identification of their risk factors. Thus, if this systemic involvement of the periodontitis will be substantiated and clarified it becomes available a new holistic approach in cardiovascular diseases control, with the inclusion of the periodontal treatment as an independent preventive measure in clinical practice.

We can conclude that the results of the present work open new perspectives in the multidisciplinary approach of the periodontal disease and the effective use of new therapeutic modalities, with significant impact on overall health. Considering the high prevalence of periodontitis, as a public health problem, we highlight the dentist's responsibility in the appropriate management of periodontitis patients, for primary prevention of systemic disorders related to oral health.

