

REZUMAT

OSTEOINTEGRAREA IMPLANTULUI DENTAR PE MODEL EXPERIMENTAL ANIMAL DE PARODONTITĂ ȘI EVALUAREA EFICIENȚEI MEDICAȚIEI ANTIRESPINGERE

Doctorand: DASCĂLU (ANCUȚA) Diana-Larisa

Coordonator științific: Prof. univ. Dr. CRIVINEANU Maria

CUVINTE CHEIE: *boală parodontală, periimplantită, microbiom, lizat bacterian, model animal*

Teza de doctorat cu titlul „*Osteointegrarea implantului dentar pe model experimental animal de parodontită și evaluarea eficienței medicației antirespingere*,” a avut ca și obiectiv primar, evaluarea eficienței lizatelor bacteriene asupra bolii parodontale și periimplantitei pe un model experimental de șobolan. Întrucât ambele afecțiuni impactează populația la nivel global, ne-am propus să reproducem bolile, pe model animal, utilizând tulpini bacteriene izolate din cavitatea orală a pacienților umani, cu scopul de a contribui la înțelegerea mecanismelor fizio-patogenetice și a aduce un aport în optimizarea schemelor terapeutice actuale ale parodontitei și periimplantitei.

Studiile experimentale din această lucrare au descris succesiv modul de inducere a bolii parodontale, dezvoltarea bolii periimplantare, urmat de expunerea tehnicii de obținere a lizatelor bacteriene și evaluarea *in vitro* a eficienței acestora. În ultima parte a cercetărilor, ne-am propus să urmărim rezultatele obținute consecutiv administrării lizatelor bacteriene asupra parodontitei și periimplantitei.

Obiectivele tezei de doctorat au fost multiple și au inclus: inducere parodontitei pe un model experimental de șobolan utilizând ca și metodă ligaturarea dinților incisivi maxilari cu fir de bumbac, urmată de contaminare cu bacterii izolate din microbiomul oral uman. Al doilea obiectiv s-a adresat inducerii periimplantitei pe modelul experimental de șobolan prin inserare de implanturi din titan pe locul primului molar maxilar, urmat de contaminarea orală cu bacterii selectate din flora orală a pacienților suferinzi de boală parodontală și/sau periimplantită. Un al treilea scop al cercetării noastre a fost de a realiza un tratament imunostimulator pe bază de lizate bacteriene obținute prin ultrasonizarea tulpinilor bacteriene responsabile de parodontită și periimplantită. Nu în ultimul rând, am verificat influența lizatelor bacteriene asupra inhibării activității microorganismelor patogene implicate în dezvoltarea celor două boli orale.

Teza respectă prevederile actuale referitoare la structurare și cuprinde două părți. În prima parte sunt expuse date importante rezultate consecutiv studiului bibliografic, iar a doua parte constituie cercetările personale.

Partea I prezintă cele mai noi date referitoare la boala parodontală și periimplantită sub aspectul etiologiei, metodelor de diagnostic și tratament aplicabile cercetărilor umane și experimentale, pe modele animale. Importanța aceste părți constă în înțelegerea mecanismelor prin care se instalează bolile, a cunoașterii factorilor de risc dar mai ales, a înțelegerii contribuției animalelor în progresul științei. Studiul bibliografic este sistematizat în patru capitole, cu un număr de 52 de pagini, care reprezintă aproximativ o treime din totalul informațiilor prezentate.

Capitolul I numit la modul general „*Boala parodontală*” oferă date actuale cu privire la etiopatogeneza bolii parodontale, la factorii de risc asociați precum și la influența acesteia asupra sănătății sistemice. Mecanismele imunopatogene declanșate de boala parodontală sunt relatate în acest capitol, la fel ca și modelele animale utilizate în cercetări asupra patogenezei, diagnosticului și mijloacelor terapeutice testate. De asemenea, am specificat care sunt principalele metode prin care parodontita se poate induce pe modelul animal, pentru a oferi o perspectivă a selectării tehnicii potrivite, în funcție de scopul propus. De o mare utilitate, atât pentru cercetările proprii cât și pentru studii viitoare în domeniu, au fost metodele actuale furnizate de literatura de specialitate, prin care se stabilește diagnosticul de boală parodontală și terapia acesteia, la om și la animale.

Capitolul II, ca și precedentul, este numit generic „*Periimplantita*” și descrie succint noțiuni privind termenul de periimplantită, factorii etiologici și epidemiologici care conduc la această afecțiune. Țesuturile din jurul implanturilor reprezintă elemente cheie pentru succesul intervențiilor de acest tip și o provocare majoră în stomatologia contemporană. Prin expunerea imunopatogenezei, a mediatorilor inflamatori precum și a susceptibilității genetice individuale pentru dezvoltarea bolii periimplantare se poate evalua starea unui pacient

și rezultatul terapiilor aplicate. Acest capitol se concentrează asupra factorilor care afectează pierderea implantului, și discută în mod cuprinzător metodele de diagnostic aplicabile atât la oameni cât și la animalele utilizate în cercetarea implanturilor. La acestea din urmă, sunt abordate principalele metode de inducere și evaluare a periimplantitei deoarece și în acest domeniu, animalele oferă un suport solid în obținerea de noi cunoștințe. În încheiere, sunt detaliate protocoalele terapeutice actuale care includ tehnici non-chirurgicale și chirurgicale, umane și animale precum și cele mai recente dovezi pentru asigurarea calității vieții legate de sănătatea orală a pacienților cu implanturi dentare.

Capitolul III poartă numele de „*Elemente comune și de diferențiere între boala parodontală și periimplantită*” și are rolul de a expune exact informațiile legate de implicarea microbiotei orale și compoziția acesteia în dezvoltarea celor două boli, de ce anume trebuie să ținem cont atunci când un pacient se confruntă cu suprapunerea afecțiunilor și mai ales, care sunt similitudinile și diferențele între studiile clinice și experimentale. În ultimul subcapitol sunt redată pe scurt, elemente importante pentru cercetătorii din domeniul implantologiei care pot fi luate în considerare atunci când se dorește testarea biocompatibilității unui implant sau evaluarea unui nou protocol terapeutic, utilizând modele animale.

Capitolul IV abordează un subiect relativ nou pentru stomatologia din zilele noastre și anume „*Lizatul bacterian ca potențial tratament al bolii parodontale și periimplantitei*”. Aici sunt prezentate mecanismele moleculare și imunologice prin care acționează lizatele bacteriene precum și utilizarea și efectul lor în terapia bolii parodontale. Prin multitudinea de asemănări dintre boala parodontală și periimplantită am dorit să extragem toate informațiile legate de potențialul terapeutic al lizatelor bacteriene și asupra periimplantitei, în literatura care descrie rolul imunostimulator al lizatelor asupra afecțiunilor orale, neexistând date suficiente care să atingă subiectul bolii periimplantare.

În **partea a II-a** sunt prezentate cercetările proprii structurate în funcție de scopul și obiectivele propuse. Astfel, în cele patru capitole am descris patru studii experimentale, trei dintre acestea fiind realizate pe model animal de șobolan, iar unul *in vitro*. Fiecare dintre subcapitole respectă ordinea expunerii procedurii experimentale, concluziile generate și recomandările bazate pe rezultatele obținute. Această parte reprezintă peste 70% din volumul total al tezei, fiind relatată în 94 de pagini în care sunt incluse 10 tabele și 77 de figuri. Toate cercetările sunt constituite din subcapitole ce ating noțiunile introductive, materialele și metodele, rezultatele și discuțiile aferente precum și concluziile parțiale după cum urmează:

Capitolul V, „*Inducere parodontitei pe un model experimental de șobolan utilizând bacterii izolate din microbiomul oral uman*”, a avut drept scop evaluarea inducerii bolii parodontale într-un model de șobolan folosind speciile bacteriene incriminate în patologia parodontozei umane.

Am inclus în studiu 20 șobolani, masculi Wistar, în vârstă de 20 de săptămâni, la care am aplicat ligaturi cu fir de retractie gingivală, pe incisivii maxilari. 5 zile/săptămână, 6 săptămâni, ligatura și sacul gingival au fost contaminate, prin gavaj, cu tulpini proaspete de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum* și *Streptococcus oralis* în concentrație de 10^9 UFC/mL. În perioada de monitorizare clinică am urmărit exprimarea semnelor clinice specifice parodontitei, evoluția greutatei corporale și am prelevat probe din cavitatea bucală pentru identificarea microbiologică a bacteriilor testate și probe de sânge pentru examenul hematologic, biochimic și imunologic. Am efectuat analiza radiologică a animalelor pentru urmărirea densității osase și la final, șobolanii au fost eutanasiați. Incisivii parodontotici prelevați au fost analizați histopatologic pentru a confirma inducerea bolii.

Simptomatologia caracteristică a bolii parodontale a fost exprimată încă din prima săptămână de studiu și s-a menținut până la final, bacteriile putând fi identificate la finalul studiului. Creșterea numărului de neutrofile, a fost semnificativă și a fost asociată cu leziunile locale de la nivelul parodonțiului. Aceste rezultate atestă faptul că procesul inflamator a fost cauzat de invazia bacteriană și care a declanșat migrarea neutrofilelor. De asemenea, indicele imunoinflamator sistemic a arătat o pronunțată reacție inflamatorie menținută până la ziua finală a experimentului, la fel ca și activitatea citokinelor proinflamatorii. Examenul biochimic a contribuit la completarea diagnosticului de parodontită prin rezultate crescute ale parametrilor ca ALT și ALKP, care semnifică inițierea procesului de resorbție osoasă, etapa finală a bolii. În urma analizei radiologice am obținut aspectul suportului osos, exprimat în mai multe grade ale densității astfel că, în fiecare dintre imaginile examinate au putut fi observate diferite stadii ale resorbției osoase. Confirmarea inducerii bolii parodontale a survenit în urma efectuării examenului histopatologic din probele de incisivi și țesut parodontal recoltate la finalul experimentului. Rezultate precum infiltrat inflamator, abcese, necroze ale ligamentului alveolo-dentar, liză osoasă, infiltrat bacterian sau inflamație piogranulomatoasă au completat panelul investigațional pentru stabilirea cu exactitate a bolii.

Coroborând datele, putem concluziona că am indus boala parodontală folosind tulpini bacteriene izolate din cavitatea orală umană, în concentrație de 10^9 UFC/mL la șobolanii la care am aplicat fir de ligatură pe incisivii maxilari.

Capitolul VI este intitulat „*Inducerea periimplantitei pe modelul experimental de șobolan prin inserare de implanturi din titan pe locul primului molar maxilar*”, iar scopul acestei cercetări a fost de a dezvolta boala periimplantară pe modelul de șobolan, prin contaminare orală cu aceleași bacterii utilizate și pentru inducerea

bolii parodontale. Studiul s-a desfășurat în trei etape: extracția primului molar maxilar pentru reproducerea edentației umane, montarea implantului și în final, contaminarea dispozitivului prin gavare cu *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum* și *Streptococcus oralis*, concentrație 10^9 UFC/mL, 5 zile/săptămână, 6 săptămâni.

Pentru acest experiment am folosit 20 de șobolani, masculi, Wistar, de 350-400 grame la debutul studiului. Extracția dentară a necesitat abordări și instrumentar similar tehnicii stomatologice umane, iar perioada necesară regenerării alveolei dentare a fost de 30 zile. A urmat implantarea dispozitivului pe locul edentat utilizând aparatul specific și de asemenea, am acordat 30 de zile pentru integrare, etapă precedată de expunerea implantului la acțiunea bacteriană și urmărirea evoluției clinice. Examenul radiologic efectuat după extracție, după montarea implantului și după finalizarea perioadei de contaminare orală, ne-a permis evaluarea densității osoase, a poziției sau pierderii implantului. Examenele hematologice realizate pe parcursul cercetării au arătat creșteri semnificative statistic pentru WBC, Hb, RBC, MCH, MCHC și PLT dar mai ales pentru nivelul de neutrofile și limfocite, iar indicele imunoinflamator sistemic a completat tabloul referitor la răspunsul inflamator declanșat ca urmare a activității microorganismelor patogene asupra țesuturilor orale.

Prin examinarea profilului hepatic și renal am emis ipoteza conform căreia periimplantita se asociază cu bolile sistemice, iar examenul histopatologic a redat leziunile de periimplantită caracterizate prin infiltratul inflamator marcant cu numeroase neutrofile și limfocite. Răspunsul organismului consecutiv procesului de resorbție osoasă a reieșit din imaginile reorganizării osoase completate de țesut fibros abundent și reacție inflamatorie pronunțată în jurul sechestrelor osoase. De asemenea, a fost observată reactivitatea țesutului gingival care a fost puternic infiltrat cu celulele liniei albe ce au delimitat fenomene piogranulomatoase, aspectul general al marginii periimplantare fiind neregulat și hiperemiat.

Prin coroborarea tuturor rezultatelor am reușit să dezvoltăm cu succes un model de periimplantită la șobolan utilizând o infecție bacteriană mixtă prin tehnica gavajului oral, afirmație susținută și prin dovada recuperării microorganismelor folosite, a finalului studiului.

Capitolul VII se numește „Realizarea unui tratament imunostimulator pe bază de lizat bacterian prin ultrasonizarea tulpinilor bacteriene folosite pentru inducerea parodontitei și a periimplantitei”. Aici sunt descrise materialele și metodele utilizate pentru a obține lizate bacteriene din tulpinile de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum* și *Streptococcus oralis* care au indus boala parodontală și periimplantară pe modelul de șobolan. Din culturi de 24 de ore am obținut produsul final, după inactivare și ruperea mecanică a peretelui bacterian. Am verificat efectul lizatului bacterian printr-un test *in vitro* care a presupus punerea în contact a acestuia cu bacteriile vii, în diferite diluții. Am mimat tratamentul prin adăugare zilnică a unei doze de lizat și am urmărit inhibarea activității bacteriene. La o a doua doză, cel puțin dublă, rezultatele au arătat că lizatul neutralizează agentul microbian în mediul lichid. Pe mediile de cultură solide am putut constata efectul inhibitor după a doua însămânțare, adică atunci când în inoculul de cultivat se regăsea doza dublă a lizatului față de bacteria vie.

Prin aceste constatări am fost încurajați spre testarea *in vivo* a lizatelor bacteriene, iar în **capitolul VIII**, pe care l-am intitulat „Evaluarea efectului antibioterapiei și a tratamentului cu lizat bacterian asupra parodontitei și periimplantitei” am comparat standardul terapeutic actual cu eficiența produsului pe bază de lizat bacterian. Am selectat pentru studiu 30 de șobolani, adulți, masculi, Wistar pe care i-am lizat în funcție de boala indusă și tratamentul aplicat, rezultând un număr de 6 grupuri: lot control de boală parodontală și lot control de periimplantită, tratat cu o soluție salină, loturile cu parodontită și periimplantită care au primit tratament cu antibiotic și antiinflamator, iar ultima categorie s-a adresat animalelor la care am dezvoltat boala parodontală, respectiv periimplantita, unde am administrat lizatul bacterian. Acest studiu complex s-a desfășurat pe o perioadă de 113 zile, timp în care am analizat animalele din punct de vedere clinic, hematologic, biochimic, imunologic, radiologic, microbiologic și în final, histopatologic.

Rezultatele obținute au arătat reducerea semnelor de inflamație a țesuturilor din jurul dinților în cazul loturilor de animale cu boală parodontală tratate cu antibiotic dar și cu lizat. Legat de evoluția bolii periimplantare, s-a constatat că rata de supraviețuire a implanturilor a fost mai mare la grupul care a primit lizat bacterian. Examenul hematologic a evidențiat scăderea celulelor albe sanguine, mai ales la animalele tratate cu antibiotic și antiinflamator, iar periimplantita supusă lizatului bacterian a menținut un indice imunoinflamator sistemic ridicat până la finalul studiului. Biochimic, după instituirea schemelor terapeutice, nu am observat o influență reflectată asupra funcțiilor organelor vitale. Examenul imunologic a acordat o atenție sporită asupra funcției biologice a IL-6 și a analizat legătura acesteia cu distrugerea țesuturilor la locul parodontal sau periimplantar comparativ cu IL-1 și TNF- α . IL-6, în urma aplicării tratamentelor, a jucat un rol protector, nivelul ei menținându-se crescut în grupurile cu parodontită și periimplantită tratate, demonstrând eficiența asemănătoare a celor două tratamente. Din punct de vedere histopatologic, leziunile decelate au confirmat atenuarea procesului inflamator în țesuturile parodontale și în sacul periimplantar, în mod asemănător pentru boala parodontală și cea periimplantară, indiferent de tratamentul aplicat. Doar în cazul periimplantitei tratată cu antibiotic, infiltratul inflamator s-a menținut crescut în probele analizate.

Prin coroborarea rezultatelor finale am putut concluziona că tratamentul cu lizat bacterian a avut un efect similar cu tratamentul standard al bolii parodontale transpus periimplantitei. Această opțiune de tratament poate fi valabilă în cazul parodontitei sau periimplantitei dezvoltate ca urmare a acțiunii bacteriilor patogene, iar o terapie personalizată pe bază de lizat bacterian ar putea reduce consumul inutil de antibiotice.

Noutatea tezei de doctorat constă în posibilitatea tratării atât a parodontitei cât și a periimplantitei cu lizate bacteriene. Dacă literatura de specialitate menționează unele rezultate obținute în urma administrării unor produse comerciale consacrate bazate pe liză bacteriană, niciodată nu am întâlnit descris un protocol care să folosească bacteriile răspunzătoare de declanșarea bolilor parodontale și periimplantare, pentru a crea un tratament care să remedieze afecțiunile. Studiile publicate până în prezent, ating doar boala parodontală, iar prin studiile noastre, am putut demonstra eficiența lizatului bacterian inclusiv asupra periimplantitei. Un alt element de noutate al lucrării l-a constituit indicele imunoinflamator sistemic aplicat atât parodontitei cât și periimplantitei. La momentul actual, niciun studiu nu a inclus în analiza celor două boli acest parametru, deși el poate fi calculat cu ușurință pe baza datelor furnizate de examenul hematologic, fiind un bun predictor al inflamației țesuturilor orale. Nu în ultimul rând, aducem un omagiu animalelor a căror implicare în cercetare este de o mare importanță pentru evoluția științifică. Studiile noastre, pe model de șobolan, au demonstrat posibilitatea dezvoltării bolii parodontale și periimplantitei prin contaminarea cavității orale cu un mix bacterian selectat de la pacienții umani, niciun alt studiu neraportând inducerea afecțiunilor cu tulpini de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum* și *Streptococcus oralis* inoculate simultan.

În **capitolul IX** am cuprins concluziile generale legate de cele patru studii experimentale precum și recomandările menite să îmbunătățească protocoalele terapeutice ale bolii parodontale și periimplantitei.

Studiul bibliografic a inclus 412 referințe, iar în marea lor majoritate acestea sunt reprezentate de publicații ale ultimilor 10 ani.

Elaborarea de noi conduite terapeutice pentru bolile parodontale și periimplantită reprezintă astăzi o preocupare majoră pentru lumea medicală, anual, cercetători din domeniul parodontologic și implantologic efectuând numeroase studii ce contribuie la actualizarea informațiilor actuale. Succesul terapeutic al parodontitei nu poate fi transpus în totalitate în periimplantită și de aceea, sunt necesare noi protocoale care să acționeze eficient asupra ambelor afecțiuni, mai ales că incidența și coexistența bolilor se află pe un trend ascendent în rândul pacienților umani.

Studiile redată în prezenta teză de doctorat sunt destinate a întregi cunoștințele vaste ce caracterizează boala parodontală și periimplantita. Totodată, rezultatele cercetărilor contribuie la elaborarea de noi tratamente pentru prevenirea și vindecarea celor două boli.