

UNIVERSITATEA “OVIDIUS” DIN CONSTANȚA
SCOALA DOCTORALĂ DE MEDICINĂ
DOMENIUL DE DOCTORAT MEDICINĂ DENTARĂ

**TEZA DE DOCTORAT
REZUMAT**

**CERCETĂRI PRIVIND ROLUL STRESULUI OXIDATIV
ÎN APARIȚIA BOLII PARODONTALE AGRESIVE –
CORELAȚII ÎNTRE CITOKINE PROINFLAMATORII ȘI
SPECII PARODONTOPATOGENE IMPLICATE**

Conducator de doctorat
Prof.univ.dr. BADEA VICTORIA

Student-doctorand
GRIGORIAN MIRCEA

CONSTANȚA, 2014

CUPRINS

INTRODUCERE.....	4
CAP. 1 REPERE ALE BOLII PARODONTALE AGRESIVE ÎN PREZENT.....	6
1.1 BOALA PARODONTALĂ AGRESIVĂ – ENTITATE CLINICĂ DISTINCTĂ ÎN CADRUL BOLII PARODONTALE.....	6
1.2 EPIDEMIOLOGIA BOLII PARODONTALE AGRESIVE.....	8
1.3 PATOGENIA BOLII PARODONTALE AGRESIVE.....	9
1.4 FACTORUL BACTERIAN ÎN BOALA PARODONTALĂ AGRESIVĂ	10
1.5 METODE DE IDENTIFICARE BACTERIOLOGICĂ DE LA SIMPLU LA COMPLEX.....	14
CAP. 2 CITOKINE.....	17
2.1 FENOMENUL INFLAMATOR ÎN BOALA PARODONTALĂ AGRESIVĂ	20
2.3 CITOKINE PROINFLAMATORII IMPLICATE ÎN BOALA PARODONTALĂ AGRESIVĂ.....	21
2.3 INTERLEUKINA 1.....	24
CAP. 3 MARKERI DE STRES OXIDATIV ÎN BOALA PARODONTALĂ.....	28
3.1 BIOMARKERI AI STRESULUI OXIDATIV ÎN BOALA PARODONTALĂ	29
3.2 MECANISME FIZIOPATOGENE ALE STRESULUI OXIDATIV ÎN BOALA PARODONTALĂ.....	32
3.3 8-HIDROXIDEOXIGUANOZINA SALIVARĂ – INSTRUMENT DE APRECIERE AL STRESULUI OXIDATIV ÎN BOALA PARODONTALĂ	35
CAP. 4 APLICAREA CUNOȘTIINȚELOR DE GENETICĂ ÎN DIAGNOSTICUL BOLII PARODONTALE.....	38
4.1 ROLUL DETERMINĂRIILOR GENETICE ÎN BOALA PARODONTALĂ	38
4.2 IDENTIFICAREA SPECIILOR PARODONTOPATOGENE PRIN INTERMEDIUL TESTELOR GENETICE.....	42
4.3 INTERLEUKINA 1 – GENOTIP ȘI FENOTIP.....	44
CAP.5 IPOTEZA DE LUCRU. OBIECTIVE GENERALE	48
5.1 SCOPUL LUCRĂRII.....	48
5.2 OBIECTIVELE LUCRĂRII.....	48
CAP. 6 METODOLOGIE GENERALĂ.....	49
6.1 STRUCTURA LOTULUI DE STUDIU.....	49

6.2 DISTRIBUȚIA EȘANTIONULUI.....	49
6.3 EXAMENUL CLINIC.....	49
6.4 PRELEVAREA ȘI TRANSPORTUL PROBELOR.....	52
6.5 METODE GENETICE.....	53
6.6 METODE IMUNOLOGICE.....	59
6.7 ANALIZA STATISTICĂ.....	63
CAP. 7 STUDIUL I – SPECIILE BACTERIENE PARODONTOPATOGENE ȘI BOALA PARODONTALĂ AGRESIVĂ.....	75
7.1 INTRODUCERE.....	75
7.2 IPOTEZA DE LUCRU.....	75
7.3 MATERIAL ȘI METODĂ.....	75
7.3.1 Colectarea probelor.....	75
7.3.2 Protocolul de analiză.....	77
7.3.3 Analiza datelor.....	81
7.4 REZULTATE.....	82
7.5 DISCUȚII.....	90
7.6 CONCLUZII PRELIMINARE.....	92
CAP. 8 STUDIUL II – INTERLEUKINA 1 ȘI BOALA PARODONTALĂ AGRESIVĂ	93
8.1 INTRODUCERE.....	93
8.2 IPOTEZA DE LUCRU.....	93
8.3 MATERIAL ȘI METODĂ.....	93
8.3.1 Colectarea probelor pentru testul genetic.....	93
8.3.2 Colectarea probelor pentru IL-1 β salivar.....	95
8.3.3 Protocolul de analiză al tehnicii de biologie moleculară.....	96
8.3.4 Protocolul de analiză al testului ELISA pentru IL-1 β salivar (Promokine)	
.....	100
8.3.5 Analiza datelor.....	101
8.4 REZULTATE.....	102
8.5 DISCUȚII	106
8.6 CONCLUZII PRELIMINARE.....	108
CAP. 9 STUDIUL III – BIOMARKERI DE STRES OXIDATIV ȘI BOALA PARODONTALĂ AGRESIVĂ.....	109
9.1 INTRODUCERE.....	109

9.2 IPOTEZA DE LUCRU.....	109
9.3 MATERIAL ȘI METODĂ.....	109
9.3.1 Protocolul de analiză.....	109
9.3.2 Principiul testului ELISA pentru 8-OHdG salivar.....	109
9.3.3 Analiza datelor.....	110
9.4 REZULTATE.....	111
9.4.1 Rezultatele obținute pentru IL-1A (-889), statusul de boală și parametrii fenotipici.....	111
9.4.2 Rezultatele obținute pentru IL-1B (+3954), statusul de boală și parametrii fenotipici.....	113
9.5 DISCUȚII.....	115
9.6 CONCLUZII PRELIMINARE.....	116
CAP. 10 EVALUAREA SENSIBILITĂȚII ȘI SPECIFICITĂȚII TESTELOR FOLOSITE	117
CAP. 11 ESTIMAREA STATISTICĂ A RISCULUI DE PROGRESIE A BOLII	121
CAP. 12 ORIGINALITATEA ȘI CONTRIBUȚIILE INOVATOARE ALE TEZEI	124
CAP. 13 CONCLUZII GENERALE	125
REFERINȚE.....	127
INDEX DE FIGURI ÎN TEXT.....	137
INDEX DE TABELE ÎN TEXT.....	140
INDEX DE GRAFICE ÎN TEXT.....	141
LISTĂ CU ABREVIERILE FOLOSITE ÎN CADRUL TEZEI DE DOCTORAT	143
LISTĂ CU LUCRĂRILE PUBLICATE DIN DOMENIUL TEZEI DE DOCTORAT	145

Cuvinte cheie: boala parodontală agresivă, specii bacteriene parodontopatogene, polimorfismul genei IL-1, biomarkeri salivari, IL-1 β salivară, 8-OHdG salivară

INTRODUCERE

Boala parodontală reprezintă conform OMS principala cauză de pierdere a dinților la adulți, frecvența îmbolnăvirii cu această boala a populației globului fiind de aproximativ 70%. Conform majorității cercetărilor și a forurilor decizionale din domeniul medicinei dentare, boala parodontală, alături de caria dentară, sunt principalele afecțiuni orodentare ale acestui secol. În această ordine de idei, eforturile combinate ale specialiștilor în domeniu se concentrează spre a descoperi noi informații cu privire la apariția și evoluția acestei boli, pentru a identifica ulterior cele mai bune metode de diagnostic, tratament și prevenire a apariției bolii parodontale.

Deși boala parodontală este cunoscută și tratată de peste 5000 de ani, demonstrarea mecanismului de apariție a bolii parodontale a suferit modificări în timp, fenomenul de boală fiind legat de evoluția rapidă a cunoștințelor de microbiologie și imunologie, precum și a modalităților de estimare a parametrilor clinici (șanț gingival și/sau pungă parodontală) și prin dezvoltarea tehnologică. Astfel, metodele moderne au identificat ca piloni principali ai patogeniei acestei boli prezența bacteriilor parodontopatogene și a intensității răspunsului imun, boala parodontală fiind în prezent inclusă în categoria de boli cu „etiologie multifactorială complexă”.

În prezenta teză, noi am folosit o tehnică moleculară de identificare de vârf și anume reacția de polimerizare în lanț, tehnica ADN-strip. Prin intermediul acestei tehnici am dorit să identificăm implicarea a cinci specii parodontopatogene cu potențial maxim în boala parodontală și anume: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* și *Prevotella intermedia*.

Un factor controversat implicat în apariția bolii parodontale agresive este terenul genetic al gazdei, mai exact polimorfismului genei IL-1.

Alături de speciile bacteriene parodontopatogene și terenul genetic, rol important în diagnosticarea precoce și monitorizarea bolii parodontale îl au markerii de stres oxidativ, fiind demonstrat în prezent rolul speciilor reactive de oxigen în alterarea ADN-ului celular și toate modificările de homeostazie celulară ce derivă din aceasta.

Pornind de la aceste considerente a apărut ideea prezentei teze, în care am dorit să cercetăm existența unor posibile corelații dintre citokinele proinflamatorii, markerii de stres oxidativ și speciile bacteriene parodontopatogene implicate în apariția bolii parodontale agresive, în vederea realizării unei scheme de diagnostic precoce și de monitorizare a acestei boli la tineri.

CAP. 1 REPERE ALE BOLII PARODONTALE AGRESIVE ÎN PREZENT

Bolii parodontale agresive i se descriu următoarele caracteristici: pierderea structurilor de fixare a dintelui însoțită de distrugerea progresivă a osului alveolar, încărcătura bacteriană necorelată cu severitatea bolii, agregare familială, frecvent este prezentă infecția cu *Actinobacilus actinomycetemcomitans*, funcție anormală a fagocitelor și răspuns amplificat al macrofagelor cu producerea de prostoglandine [3,10].

Organizația Mondială a Sănătății declară în 2012 o incidență a bolii parodontale de 15-20% [11] și propune ca strategii de prevenire a acesteia implementarea de programe destinate întreruperii consumului de tutun dar și de implementare a unor bune practici pentru sănătate oro-dentară, cum ar fi periajul dentar și folosirea aței dentare [12].

Socransky ș.a. [23] precizează organizarea bacteriilor prezente în zonele parodontale în „*complexes bacteriene*”, care acționează prin asocieri succesive până la apariția leziunilor specifice bolii parodontale [24].

CAP. 2 CITOKINE

Toate celulele organismului, inclusiv cele care intră în componența sistemului imun, realizează schimburi de informație prin intermediul unor mediatori care formează superfamilii de citokine sau chemokine, cu rol major în sistemul de apărare al organismului, fiind implicate în principal în multiple fenomene patologice [33].

În cadrul reacției inflamatorii, ca parte a răspunsului imun, citokinele proinflamatorii, care se activează în cascadă (după secvența TNF- α , IL-1 beta, IL-6, IL-8, IFN- γ), contracarează efectul protectiv al citokinelor anti-inflamatorii [38].

Genele care codifică IL-1 includ IL-1A, IL-1B și IL-1RN, toate acestea fiind localizate în aceeași regiune cromozomială, 2q13 (cromozomul 2, brațul lung, regiunea 1, banda 3).

CAP. 3 MARKERI DE STRES OXIDATIV ÎN BOALA PARODONTALĂ

Biomarkerii sunt molecule produse în organismul indivizilor sănătoși sau de către pacienții care prezintă o afecțiune, ei fiind folosiți în monitorizarea statusului clinic, în identificare momentului de debut al bolii sau a răspunsului obținut în urma unui tratament [59]. Saliva poate fi folosită pentru a monitoriza starea generală de sănătate dar și pentru a identifica debutul anumitor boli [63].

Peroxidul de hidrogen poate să treacă de membrana nucleului și să producă modificări de nivelul ADN-ului, inclusiv oxidarea nucleotidelor [77]. 8-hidroxideoxiguanozina (8-OHdG) este un nucleotid oxidat care se elimină în salivă, numeroase studii demonstrând faptul că dozarea acestui biomarker poate fi utilă în cuantificarea stresului oxidativ din cadrul bolii parodontale [65, 66, 70, 77].

CAP. 4 APLICAREA CUNOȘTIINȚELOR DE GENETICĂ ÎN DIAGNOSTICUL BOLII PARODONTALE

Printre primele cercetări genetice în boala parodontală au fost cele efectuate de către Kornman K.S. [88] în anul 1997 care a studiat genotipul interleukinei 1 ca factor de severitate al acestei boli. Dacă până în acel moment studiile prezentau relația dintre bacteriile parodontopatogene și calitatea de fumător și evoluția bolii parodontale, autorul evidențiază faptul că genotipul IL-1 poate fi un predictor folositor în cadrul bolii, pentru un grup de nefumători. El apreciază faptul că deși boala parodontală poate fi diagnosticată clinic, medicii pot folosi pentru prima dată un marker genetic pentru a identifica persoanele predispuse bolii parodontale, exceptând gradul de încărcare bacteriană.

Putem concluziona că boala parodontală agresivă este exprimarea fenotipică a factorilor de mediu (statusul de fumător, stil alimentar, stres), a profilului genetic (polimorfisme) și a interacțiunilor biologice (genă-genă sau genă-mediu) [101].

CAP.5 IPOTEZA DE LUCRU. OBIECTIVE GENERALE

5.1 SCOPUL LUCRĂRII

Lucrarea are ca scop cercetarea fundamentală prin studii de genetică, biochimie și microbiologie în boala parodontală agresivă.

5.2 OBIECTIVELE LUCRĂRII

Obiectivul general al acestei lucrări este de a cerceta existența unor posibile corelații dintre citokinele proinflamatorii, markerii de stres oxidativ și speciile bacteriene parodontopatogene implicate în apariția bolii parodontale agresive, în vederea realizării unei scheme de diagnostic precoce și de monitorizare a acestei boli la tineri.

CAP. 6 METODOLOGIE GENERALĂ

6.1 STRUCTURA LOTULUI DE STUDIU

Populație: Populația studiată a fost reprezentată persoanele cu vârste între 35 - 44 din județul Constanța, România.

Eșantion: Pentru stabilirea eşantioanelor reprezentative pentru aceste grupe de vârstă s-a utilizat metoda eşantionării stratificate multistadiale, realizate pe 3 niveluri: la nivel de mediu de viață (rural, urban), la nivel de localități (selecție aleatoare proporțională) și la nivel de unități de medicină de familie (selecție aleatoare proporțională). Eşantioanele de studiat au fost apoi extrase prin selecție sistematică prin pas statistic, folosind drept cadru de eşantionare listele complete ale pacienților înscriși pe listele medicilor de familie din unitățile selectate pentru studiu. Eşantionul necesar inițial, calculat pentru un nivel de încredere de 95%, cu o eroare de eşantionare de 6% și un nivel estimat al fumătorilor și al bolii parodontale de 50% în populația studiată, a fost de 379 subiecți cu vârste cuprinse 35-44 ani. [102, 103, 104].

6.2 DISTRIBUȚIA EȘANTIONULUI

Rata de răspuns a fost de 77,30% (86 subiecți au refuzat participarea la studiu). După excluderea a 7 subiecți din studiu (vânzători de tutun), eşantionul final a cuprins **286 subiecți** (6% eroare de eşantionare; 95% nivel de încredere), cu o medie de vârstă de $484,01 \pm 41,80$ luni, 38,1% bărbați (n=109) și 61,9% femei (n=177) [102, 103, 104].

6.3 EXAMENUL CLINIC

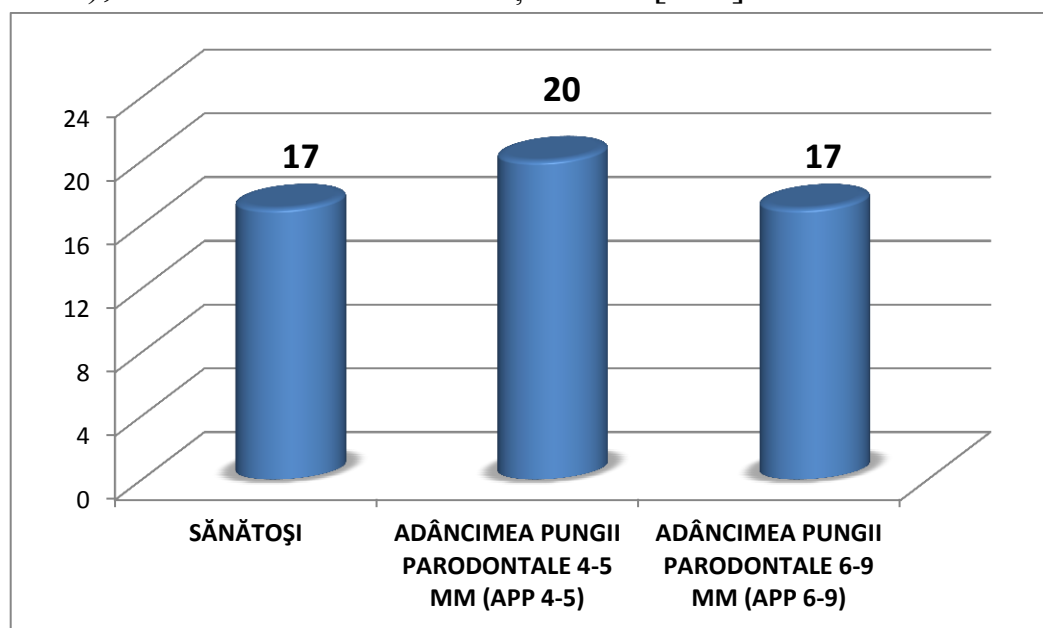
Examenul clinic al cavității orale a fost realizat prin inspecție, palpare și percuție, cu accent pe examinarea parodontală. S-a înregistrat INDICELE CPITN (*Community Periodontal Index of Treatment Need*).

Distribuția scorurilor maxime CPITN a arătat că doar un procent de 8% (n=23) dintre subiecți au un parodonțiu sănătos, 42,7% prezintă tartru și 46.5% prezintă pungi parodontale (n=133).

În studiul prezent au fost incluși:

- toți subiecții sănătoși nefumători (17 subiecți dintre cei 23 subiecți cu indice cpitn=0);
- toți subiecții nefumători ce au prezentat parodontită agresivă (37 subiecți dintre cei 133 de subiecți cu diverse stadii ale bolii parodontale și pungi parodontale de peste 3 mm).

Așa cum este prezentat și în literatura de specialitate am împărțit grupul de studiu (Graficul 1) în: lotul martor (SĂNĂTOȘI), în care am inclus subiecții cu APP între 0 și 3 mm, lotul de pacienți cu pungă parodontală cu adâncime medie, între 4 și 5 mm (APP 4-5), și lotul de pacienți cu adâncimea pungii parodontale cuprinsă între 6 și 9 mm (APP 6-9), conform Silvestre F.J. și colab [105].



Graficul 1. Distribuția subiecților în loturi de studiu

S-a obținut acordul comisiei de etică a Universității Ovidius Constanța pentru a respecta principiile de etică pentru cercetarea medicală care implică subiecți umani. Subiecții au fost informați cu privire la scopul investigațiilor. Subiecții au participat la studiu pe baza unui consimțământ informat care a fost semnat de către aceștia.

6.4 PRELEVAREA ȘI TRANSPORTUL PROBELOR

A fost realizată în aceeași ședință cu examenul clinic dar imediat înaintea efectuării acestuia, pentru a evita eventuala contaminare cu sânge a probelor de fluide orale. Recoltarea de salivă s-a realizat prin tehnici diferite în funcție de metodele de laborator folosite și vor fi descrise la fiecare studiu în parte.

6.5 METODE GENETICE

Metoda genetică folosită pentru identificarea bacteriilor parodontopatogene și a genotipului IL-1 este Reacția de Polimerizare în Lanț – tehnica Strip-ADN.

6.6 METODE IMUNOLOGICE

Ca metodă imunologică am folosit tehnica ELISA. [109, 110]

6.7 ANALIZA STATISTICĂ

Rezultatele obținute au fost analizate statistic folosind programul IBM SPSS STATISTICS 20.

CAP. 7 STUDIUL I – SPECIILE BACTERIENE PARODONTOPATOGENE ȘI BOALA PARODONTALĂ AGRESIVĂ

7.1 INTRODUCERE

Scopul acestei cercetări este de a evidenția posibila relație dintre speciile bacteriene parodontopatogene și posibila lor implicare în debutul bolii parodontale agresive, folosind o metodă de vârf pentru identificare și anume, reacția de polimerizare în lanț ADN-strip.

7.2 IPOTEZA DE LUCRU

Obiectivul general al acestui studiu este de a cerceta corelațiile dintre speciile bacteriene parodontopatogene implicate în apariția bolii

parodontale agresive, în vederea realizării unei scheme de diagnostic precoce și de monitorizare a acestei boli la tineri.

7.3 MATERIAL ȘI METODĂ

7.3.1 Colectarea probelor

Am colectat probe de placă parodontală din 5 pungi parodontale la fiecare subiect. Am folosit un kit de recoltare fabricat de HainLifescience.

7.3.2 Protocolul de analiză

Testul MicroIDent® se bazează pe tehnologia ADNstrip și permite identificare genetică moleculară combinată a 5 specii de bacterii parodontopatogene, și anume: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphynomonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia* și *Treponema denticola*. [107]

7.4 REZULTATE

Conform clasificării oferite de Socransky și acceptate și de producătorul materialului de analiză, am stabilit gruparea bacteriilor parodontopatogene în 3 clase: complexul Aa (care cuprinde doar bacteriile din grupul *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* - Aa), complexul roșu (care cuprinde bacteriile din clasele *Porphynomonas gingivalis* - Pg, *Tannerella forsythia* – Tf, *Treponema denticola* - Td) și complexul portocaliu (care include bacteriile din clasa *Prevotella intermedia* - Pi).

Am ales să evaluăm semnificația statistică a speciilor parodontopatogene separat, pornind de la specia bacteriană de vârf din punct de vedere al patogenității (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*), speciile bacteriene ale complexului roșu și Pi considerate separat, apoi combinații între Aa și speciile bacteriene ale complexului roșu, speciile bacteriene ale complexului roșu cuplate cu Pi, Aa și Pi și în final combinație între toate speciile bacteriene. Această alegere am facut-o având la bază datele din literatura de

specialitate precum și o estimare statistică privind toate speciile bacteriene considerate în studiu conform metodei moleculare de identificare folosită în cercetarea noastră.

Pentru toate variantele evaluate, am observat că există diferență semnificativă statistic privind prezența acestor specii bacteriene între grupul de sănătoși și cele cu boală parodontală agresivă, atât între sănătoși și pacienții cu APP 4-5, $p < 0,05$, dar și între sănătoși și APP 6-9, $p < 0,05$.

Este de notat faptul că între cele două grupuri de pacienți nu avem diferență semnificativă statistic privind prezența speciilor bacteriene parodontopatogene, $p > 0,05$, aceste date venind să confirme încă o dată poziția acestor specii parodontopatogene la pacienții cu boală parodontală agresivă, indiferent de gradul de adâncime al pungii parodontale.

7.5 DISCUȚII

Așa cum susțin majoritatea studiilor boala parodontală agresivă este o boală multifactorială în etiologia căreia, unul din factori este reprezentat de prezența microflorei bacteriene. Cele mai frecvente specii bacteriene studiate și asociate cu prezența bolii parodontale agresive sunt *A. actinomycetemcomitans* și *P. gingivalis*, iar lista este completată de *P. intermedia*, *T. forsythia* și *T. denticola* [117].

Rezultatele noastre sunt în concordanță cu majoritatea studiilor care indică faptul că, întrededvăr, *A. actinomycetemcomitans* este asociată cu boala parodontală agresivă [118, 119].

Rezultatele studiului nostru arată că asocierea dintre *A. actinomycetemcomitans* și *P. intermedia* este prezentă la grupurile de pacienți evaluați în studiu.

Într-un studiu realizat în Japonia prin intermediul tehnicii PCR, autorii au prezentat faptul că *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* și *T. forsythia* au fost identificate în număr mare în pungile parodontale la pacienții cuprinși în studiu și chiar mai mult, că nu

există diferențe semnificative statistic între prezența acestor specii bacteriene la pacienții cu boală parodontală agresivă față de cei cu forma cronică [121]. Rezultatele sunt similare cu cele obținute de noi, asocierea dintre *A. actinomycetemcomitans* și speciile bacteriene din complexul roșu fiind frecvent întâlnită la pacienții noștri.

Un studiu foarte recent (2014, Wang X. și colab.) realizat pe un grup populațional din China, prezintă faptul că prezența *A. actinomycetemcomitans* se poate corela cu boala parodontală agresivă [123]; autorii identifică prezența acestei specii bacteriene atât la pacienții cu pungă parodontală mică, cât și la cei cu pungă parodontală adâncă, așa cum reiese și din rezultatele studiului nostru.

Putem aprecia că în prezent, părerile marilor specialiști în domeniu, legate de implicarea speciilor parodontopatogene în etiopatogenia bolii parodontale agresive sunt împărțite. În această ordine de idei, Kononen E. și Muller H.P. prezintă în studiul lor faptul că deși în ultimele decade cercetătorii au acordat importanță asocierii dintre *A. actinomycetemcomitans* și boala parodontală agresivă, autorii consideră această specie bacteriană ca fiind o componentă minoră a florei bacteriene din cavitatea orală și doar la unii indivizi are rol de patogen oportunist. Autorii consideră ca agenți patogeni în boala parodontală agresivă speciile bacteriene din complexul roșu și cel orange. De asemenea, aceiași autori evidențiază faptul că studiile sunt realizate pe grupuri populaționale diferite din punct de vedere al locației geografice și al etniei, aspect care trebuie luat în considerare atunci când se realizează diverse comparații între rezultate [125].

7.6 CONCLUZII PRELIMINARE

- 1. Studiul nostru demonstrează că există o strânsă corelație între prezența speciilor bacteriene parodontopatogene identificate și statusul clinic exprimat prin adâncimea pungii parodontale, elemente care susțin implicarea bacteriilor în etiologia bolii parodontale agresive;***

2. *Cea mai înaltă corelație s-a demonstrat a fi între adâncimea pungii parodontale și prezența bacteriilor parodontopatogene, specia *A.actinomycescomitans*, urmată de asocierile dintre *A.actinomycescomitans* cu *P. intermedia* sau cu complexul roșu;*
3. *Cea mai slabă corelație este între adâncimea pungii parodontale și prezența speciilor bacteriene parodontopatogene din cadrul complexului roșu și/sau *P. intermedia*;*
4. *Din studiul nostru reiese că nu există diferențe semnificativ statistice între prezența speciilor bacteriene și mărimea adâncimii pungii parodontale.*

CAP. 8 STUDIUL II – INTERLEUKINA 1 ȘI BOALA PARODONTALĂ AGRESIVĂ

8.1 INTRODUCERE

Scopul acestei etape a cercetării este de a evidenția posibila relație dintre identificarea profilului genetic legat de polimorfismul genei IL-1 și biomarkerul de stress oxidativ IL-1 β salivar la pacienții cu boală parodontală agresivă, folosind o metodă de vârf pentru identificare și anume, reacția de polimerizare în lanț ADN-strip, respectiv reacția ELISA.

8.2 IPOTEZA DE LUCRU

Obiectivul general al acestei lucrări este de a cerceta corelațiile dintre profilul genetic legat de polimorfismul genei IL-1, citokina proinflamatorie IL-1 β salivar și apariția bolii parodontale agresive, în vederea realizării unei scheme de diagnostic precoce și de monitorizare a acestei boli la tineri.

8.3 MATERIAL ȘI METODĂ

8.3.1 Colectarea probelor pentru testul genetic

Am colectat probe de salivă de la fiecare subiect. Am folosit un kit de recoltare fabricat de HainLifescience.

8.3.2 Colectarea probelor pentru IL-1 β salivar

Pentru testul ELISA probele de salivă au fost colectate prin metoda standard (colectarea pasivă a salivei în recipiente sterile). [109]

8.3.3 Protocolul de analiză al tehnicii de biologie moleculară

Testul GenoType IL-1 β ® se bazează pe tehnologia ADNstrip și permite identificarea genetică moleculară combinată a polimorfismului IL-1A -889, IL-1B +3953 și IL-1RN +2018 al locusului genetic al interleukinei 1. [108]

8.3.4 Protocolul de analiză al testului ELISA pentru IL-1 β salivar (Promokine)

Pentru determinarea biomarkerului IL-1 β s-a folosit metoda ELISA, tehnica sandwich, conform indicațiilor producătorului (Promokine, USA).

8.4 REZULTATE

Este de subliniat faptul că majoritatea persoanelor luate în studiu prezintă profil heterozigot (CT) și aparțin lotului de pacienți cu boală parodontală agresivă. Remarcăm identificarea în lotul de sănătoși a unui număr mic de subiecți care prezintă genotip homozigot TT pentru genele IL-1.

Dacă luăm în considerare frecvența genotipurilor IL1A la grupurile de studiu se poate observa că există o diferență semnificativă statistic a prezenței genotipului CT între grupul de sănătoși și cel cu boală parodontală agresivă, $p = 0,0237$. Pentru prezența genotipului TT între grupul de sănătoși și cel cu boală parodontală agresivă am obținut o diferență înalt semnificativ statistică, $p = 0,0006$. Însă, nu există diferență semnificativă statistic privind prezența genotipului CC între grupul de sănătoși și cel cu boală parodontală agresivă, $p = 0,7349$.

În ceea ce privește frecvența genotipurilor IL1B la grupurile de studiu se poate observa că există o diferență înalt semnificativ statistică atât între prezența genotipului CT identificat la grupul de sănătoși și cel cu boală parodontală agresivă, $p = 0,0015$, cât și între prezența genotipului TT la cele două grupe de subiecți evaluate, $p = 0,0001$. De asemenea nu am obținut o diferență semnificativă statistic între prezența genotipului CC între grupul de sănătoși și cel cu boală parodontală agresivă, $p = 0,4944$.

În cazul genei IL-1B am obținut de asemenea diferențe înalt semnificativ statistice ($p = 0,000$) între valorile IL-1 β și cele trei genotipuri identificate prin testul PCR.

8.5 DISCUȚII

În literatura de specialitate sunt prezentate studii care au identificat corelațiile dintre modificările genetice ale genei IL-1 și existența bolii parodontale agresive [126, 127, 128, 129]. Există în lume puține studii care au reușit să prezinte o corelație între defectul genetic, cuantificarea fenotipică al IL-1 și statusul de boală, în România aceste studii fiind absente, ceea ce ne permite să afirmăm că rezultatele obținute de noi sunt de noutate absolută.

În literatura actuală de specialitate sunt prezentate studii care susțin existența unei asocieri dintre polimorfismul genelor IL-1 și boala parodontală agresivă. Astfel, Safonova A.V. și colab. [132] prezintă faptul că defectul genetic al IL-1B influențează expresia fenotipică a acesteia, iar prin asociere cu polimorfismul IL-6, duc la creșterea severității bolii; în această ordine de idei s-a observat că în această asociere au fost identificate *A. actinomycetemcomitans* împreună cu *P. gingivalis*, conturându-se o nouă paradigmă legată de corelația dintre aceste polimorfismul acestor gene, expresia fenotipică și eventuala potențare a colonizării cu specii bacteriene parodontopatogene în condițiile prezenței unor defecte genetice.

În ultimii 10 ani, studiile au arătat că severitatea bolii parodontale este strâns legată de polimorfismul genei IL-1 dar și de mediatori inflamatori locali, printre care IL-1 beta joacă un rol important [134]; astfel, Guzeldemir și colab. [135] a identificat o asociere extrem de semnificativă statistic între polimorfismului genei IL-1 și boala parodontală agresivă la un grup populațional din Turcia. De asemenea, conform Quappe și colab. [136], în populația chiliană polimorfismului genei IL-1 a fost identificat la 25% dintre pacienții cu boală parodontală cu debut precoce. În alt studiu realizat pe un eșantion populațional din Danemarca, Havemose-Poulsen și colab. [137] au identificat o asocierea între genotipurile IL-1 și boala parodontală agresivă. Rezultate similare au fost raportate de către Parkhill [138] care a identificat existența unei asocieri între parodontita agresivă și predominanța polimorfismului genei IL-1 la un grup populațional din UK.

Rezultatele studiului nostru sunt foarte asemănătoare cu cele ale autorilor mai sus menționați, existând o diferență înalt semnificativă statistic între prezența polimorfismului genelor IL-1 și boala parodontală agresivă (profil genetic IL-1B TT).

Corelația dintre polimorfismul genelor IL-1B și expresia genetică materializată prin cantitatea IL-1beta sintetizată, rămâne însă un subiect controversat, urmând ca într-un viitor apropiat, extinderea studiilor pe loturi mai mari de subiecți și pe grupuri populaționale variate din punct de vedere genetic să ducă la elucidarea acestui subiect. În această ordine de idei sunt prezentate în literatura de specialitate actuală și rezultatele unor studii care arată că nu există corelație între polimorfismul genelor IL-1 și boala parodontală agresivă; astfel, rezultatele obținute au fost realizate pe grupuri populaționale diferite din punct de vedere genetic - caucazieni, africani, Asia de Est [97, 99, 139, 140, 141, 142, 143, 144].

Majoritatea autorilor enumerați mai sus concluzionează că e posibil ca defectul genetic să nu fie singular, boala putând fi cauzată de alterări ale materialului genetic la mai multe gene [97, 143, 145].

8.6 CONCLUZII PRELIMINARE

- 1. Studiul nostru demonstrează că există diferențe semnificative statistic între profilul genetic al IL-1 la pacienți cu boală parodontală agresivă comparativ cu lotul de sănătoși;*
- 2. În ceea ce privește asocierea dintre profilul genetic și fenomenul de boală, rezultatele noastre demonstrează că există o corelație (foarte înaltă pentru IL-1B și înaltă pentru IL-1A) între polimorfismul genetic și statusul clinic;*
- 3. Cea mai înaltă semnificație statistică am obținut-o pentru prezența genotipului TT la toate genele IL-1 studiate, urmată de cea pentru genotipul CT.*
- 4. Nu există diferență semnificativă statistic privind prezența genotipului CC între sănătoși și pacienți cu boală parodontală agresivă pentru niciuna dintre genele IL-1 evaluate*
- 5. Există o corelație înaltă între profilul genetic al IL-1B și exprimarea fenotipică a acestora, respectiv cantitatea de IL-1beta cuantificată în salivă.*

CAP. 9 STUDIUL III – BIOMARKERI DE STRES OXIDATIV ȘI BOALA PARODONTALĂ AGRESIVĂ

9.1 INTRODUCERE

Scopul acestei etape a cercetării este de a evidenția posibila relație dintre statusul de boală (exprimat prin adâncimea pungii parodontale), profilul genetic (polimorfismul genelor IL-1) și biomarkerii de stress oxidativ (IL-1 β și 8-OHdG salivari).

9.2 IPOTEZA DE LUCRU

Obiectivul general al acestui studiu este de a cerceta corelațiile dintre statusul de boală, citokinele proinflamatorii și markerii de stres oxidativ implicați în apariția bolii parodontale agresive, în vederea realizării unei scheme de diagnostic precoce și de monitorizare a acestei boli la tineri.

9.3 MATERIAL ȘI METODĂ

Am colectat probe de salivă de la fiecare subiect. Pentru probele genetice și pentru determinarea cantitativă a IL-1 β salivar metodele de recoltare au fost descrise în cadrul studiilor mai sus prezentate.

Pentru 8-OHdG probele obținute au fost centrifugate la 8000 rpm timp de 10 minute. [110]

9.3.1 Protocolul de analiză

Pentru testele genetice și pentru IL-1 β salivar am prezentat protocoalele de analiză în capitolele anterioare. În cadrul acestui studiu voi prezenta tehnica de determinare ELISA pentru 8-OHdG salivar.

9.3.2 Principiul testului ELISA pentru 8-OHdG salivar

Pentru determinarea biomarkerului 8-OHdG s-a folosit metoda ELISA, tehnica competitivă, conform indicațiilor producătorului (Cayman Chemical, USA).

9.4 REZULTATE

9.4.1 Rezultatele obținute pentru IL-1A (-889), statusul de boală și parametrii fenotipici

Există o diferență înalt semnificativă statistic ($p < 0,001$) între valorile medii ale cantității de IL-1 β salivară în funcție de statusul clinic și genotipurile IL-1A.

Analizând rezultatele se poate observa că influența variabilelor independente (status clinic și genotip IL-1A) asupra variabilei

dependente (IL-1beta salivară) introduse în modelul Two Way Anova este înalt semnificativă statistic ($p < 0,001$).

De asemenea, observăm că există o corelație puternică între statusul clinic, genotipurile IL-1A și cantitatea de 8-OHdG salivară. Analizând rezultatele obținute s-a observat că influența parametrilor introduși în modelul Two Way Anova este înalt semnificativă statistic ($p < 0,001$).

9.4.2 Rezultatele obținute pentru IL-1B (+3954), statusul de boală și parametrii fenotipici

Rezultatele indică faptul că există o corelație puternică între statusul clinic, genotipurile IL-1B și cantitatea de IL-1beta salivară. Din analiza rezultatelor noastre se observă că influența factorilor introduși în modelul Two Way Anova este înalt semnificativă statistic ($p < 0,001$).

Există o corelație puternică între statusul clinic, genotipurile IL-1B și cantitatea de 8-OHdG salivară. De asemenea, pentru 8-OHdG, putem spune că există o influență înalt semnificativă statistic pentru factorii introduși în modelul Two Way Anova ($p < 0,001$).

9.5 DISCUȚII

Studiul nostru este de noutate absolută în România, pentru că nu s-a efectuat până în prezent o evaluare a modificărilor genetice ale genei IL-1 în paralel cu prezența bacteriilor și a stresului oxidativ în contextul bolii parodontale agresive.

În literatura de specialitate există numeroase studii care dovedesc existența unei asocieri între nivelul salivar al 8-OHdG și prezența bolii parodontale agresive. Sezer și colab. [65] prezintă în studiul său faptul că există o corelație înalt semnificativă statistic între valorile salivare ale 8-OHdG și indicii clinici. De asemenea, Canakci și colab. [64, 76] prezintă în mai multe studii faptul că nivelul salivar de 8-OHdG este un biomarker care se identifică precoce în cazul denaturării ADN-ului mitocondrial de la nivelul țesutului gingival,

datorită proceselor oxidative, la pacienții cu boală parodontală agresivă.

Takane și colab. [146] indică de asemenea în studiul său faptul că nivelul salivar al 8-OHdG se corelează puternic cu adâncimea pungii parodontale; mai mult chiar, autorul precizează că acest biomarker poate fi folosit cu succes în diagnosticarea și monitorizarea pacienților cu boală parodontală.

În studiile noastre anterioare [67, 68, 69] am prezentat faptul că 8-OHdG salivar este un biomarker sensibil, care se pozitivează chiar înainte de apariția semnelor clinice de boală parodontală, ceea ce îl propune ca element foarte util în practica de zi cu zi a medicului dentist, în diagnosticarea precoce a bolii parodontale, fiind un potențial instrument de screening în această boală.

Mai mult decât atât, există numeroase studii care demonstrează cu succes utilitatea acestui biomarker salivar și îl propun ca instrument de monitorizare al eficienței tratamentului bolii parodontale [66, 68, 69, 146].

Noi am demonstrat faptul că prezența bacteriilor, genotipul-fenotipul IL-1 și cantitatea de 8-OHdG sunt în corelație puternică cu statusul clinic oro-dentar, în literatura de specialitate neexistând studii care să coreleze parametrii mai sus menționați.

9.6 CONCLUZII PRELIMINARE

- 1. Studiul nostru demonstrează că există o legătură strânsă între profilul genetic și boala parodontală agresivă;***
- 2. Există o asocierie între polimorfismul genetic și evaluarea procesului inflamator și al nivelului de stres oxidativ, exprimat prin valorile IL-1beta și respectiv 8-OHdG salivare, determinate în boala parodontală agresivă.***

CAP. 10 EVALUAREA SENSIBILITĂȚII ȘI SPECIFICITĂȚII TESTELOR FOLOSITE

Pentru a demonstra valoarea testelor folosite în explorarea paraclinică în ideea de a realiza o ierarhizare a acestora am efectuat o analiză statistică privind sensibilitatea și specificitatea acestora.

Dat fiind faptul că în prezent tehnica PCR este tehnică de vârf apreciată de specialiști în domeniu ca fiind cea mai sensibilă și cea mai specifică modalitate de identificare și cuantificare a unui parametru, am decis să analizăm sensibilitatea și specificitatea metodei ELISA folosită pentru cuantificarea IL-1 β și 8-OHdG salivar. Am realizat această evaluare prin intermediul curbei ROC, curbă care identifică și valoarea cut-off care discerne în cadrul șirului de rezultate valorile de normal de cele patologice.

Valoarea estimată (*cut-off value*) pentru variabila IL-1 β care poate distinge între cele două grupuri (sănătoși și bolnavi) în condițiile unei sensibilități (Se) și Specificități (Sp) maxime, este 30,001 pg/mL.

Aria de sub curba ROC trasată pentru variabila IL1beta ($A = 0,943$) diferă semnificativ de valoarea 0,5 (1/2 din aria pătratului). Probabilitatea calculată asociată acestei valori este $p = 0,0001 < \alpha = 0,05$. În aceste condiții se poate afirma că variabila menționată are abilitatea de a distinge între cele două grupuri sănătoși și pacienți cu boală parodontală agresivă.

De asemenea valoarea estimată (*cut-off value*) pentru variabila 8-OHdG care poate distinge între cele grupul de sănătoși și cel cu boală parodontală agresivă, în condițiile unei sensibilități (Se) și Specificități (Sp) maxime, este de 1,43 ng/mL.

Și în cazul 8-OHdG, aria de sub curba ROC trasată ($A = 0,982$) diferă semnificativ de valoarea 0,5 (1/2 din aria pătratului). Probabilitatea calculată asociată acestei valori este $p = 0,0001 < \alpha = 0.05$. Astfel putem afirma că această variabilă are abilitatea de a distinge între grupurile de Sănătoși și Pacienți cu boală parodontală agresivă.

În continuare am comparat curbele ROC pentru a stabili care dintre cele două variabile poate distinge mai corect între grupurile de sănătoși și pacienți cu boală parodontală agresivă, sau altfel spus, care dintre cele două teste este mai sensibil.

Având în vedere rezultatul testului, cu o diferență între arii de 0,039 și un nivel de semnificație statistic $p = 0,231 > 0,05$, putem concluziona că cele două teste sunt sensibil egale.

CAP. 11 ESTIMAREA STATISTICĂ A RISCULUI DE PROGRESIE A BOLII

Riscul Relativ (RR), adică raportul dintre proporțiile cazurilor care au produs un eveniment pozitiv ($Aa = \text{PREZENT}$) în cele două grupuri de pacienți cu boală parodontală agresivă vs. sănătoși este 10,56, valoare semnificativă statistic (intervalul de confidență 95% IC = 1,55-71,93).

Dat fiind faptul că speciile bacteriene menționate au fost identificate și la subiecți sănătoși, am considerat util să calculăm riscul relativ de progresie a bolii în condițiile prezenței acestor specii bacteriene. Astfel, identificarea prezenței speciei bacteriene Aa la bolnavii cu boală parodontală agresivă duce la progresia bolii de 10,56 ori mai mult decât la subiecții sănătoși parodontal la care s-a identificat această specie bacteriană.

Similar, asocierea dintre prezența speciei Aa cu IL-1 β , duce la progresia bolii de 12,48 ori mai mult la bolnavii cu boală parodontală agresivă, în timp ce asocierea dintre 8-OHdG și prezența Aa conduce la progresia bolii de 4,63 ori mai mult la pacienții cu boală parodontală agresivă.

În cazul în care se asociază valori crescute ale cantităților de IL-1 β cu 8-OHdG salivare, se observă o progresie a bolii de 3,47 ori mai mult la bolnavii cu boală parodontală agresivă.

Pentru asocierea variantelor genetice ale IL-1B și cantitățile de IL-1 β salivară, se observă că prezența genotipului CT duce la o

progresie a bolii de 4,72 de ori mai mult la bolnavii cu boală parodontală agresivă, iar prezența genotipului TT duce la progresia bolii de 5,23 ori mai mult.

În ceea ce privește asocierea dintre adâncimea pungii parodontale și prezența Aa se observă că duce la o progresie a bolii de 2,48 de ori mai mult la bolnavii cu boală parodontală agresivă; de asemenea asocierea dintre APP cu IL-1 β salivară duce la o progresie a bolii de 6,09 de ori mai mult, în timp ce asocierea dintre APP cu 8-OHdG salivară duce la o progresie a bolii de 17,41 de ori mai mult la bolnavii cu boală parodontală agresivă.

CAP. 12 ORIGINALITATEA ȘI CONTRIBUȚIILE INOVATOARE ALE TEZEI

Originalitatea tezei constă în evaluarea în paralel a unor markeri de stres oxidativ de estimare a bolii parodontale, în condițiile în care, în literatura de specialitate, aceștia sunt estimați separat.

Ideea realizării acestui paralelism a venit consecutiv dezvoltării stadiului actual al cunoașterii legat de etiopatogenia bolii parodontale, în care galopant sunt descoperiți noi și noi factori implicați direct și indirect în apariția acestei boli.

Considerăm de asemenea că originalitatea tezei rezidă din modul în care s-au corelat studiul stresului oxidativ cu citokinele proinflamatorii și speciile bacteriene parodontopatogene în paralel cu modificări genetice, respectiv cu polimorfismul unor gene.

Acuratețea rezultatelor obținute prin tehnici de înaltă performanță – tehnica PCR – susțin implementarea testelor genetice privind identificarea subiecților care prezintă polimorfism al genelor IL-1 și în concluzie risc crescut de apariție al bolii parodontale.

Rezultatele tezei aduc contribuții inovatoare legate de actualizarea cunoștințelor privind diagnosticul, monitorizarea și prognosticul bolii parodontale. În același timp, considerăm că o

contribuție inovatoare a tezei este dată de posibilitatea utilizării biomarkerului 8-OHdG salivar în screeningul bolii parodontale.

Rezultatele noastre susțin în egală măsură posibilitatea utilizării ca biomarker și a speciei *A. Actinomycetemcomitans* dat fiind faptul că această specie a fost identificată la subiecți sănătoși care ar necesita în timp o monitorizare în vederea preântâmpinării instalării bolii parodontale.

Considerăm în final că toate acestea sunt argumente care susțin contribuția rezultatelor tezei în optimizarea schemei de diagnostic a bolii parodontale.

CAP. 13 CONCLUZII GENERALE

- ❖ Rezultatele obținute privind evaluarea tuturor parametrilor pe care i-am luat în studiu, raportați la starea de normal și patologic a parodonțiului, arată că fiecare dintre aceștia este relevant în cadrul diagnosticului bolii parodontale agresive.
- ❖ Studiile genetice privind identificarea speciilor parodontopatogene demonstrează că *A. actinomycetemcomitans* și combinația dintre *A. actinomycetemcomitans* cu *P. intermedia* au fost cel mai frecvent identificate ca specii microbiene în producerea bolii parodontale agresive.
- ❖ Studiile privind profilul genetic legat de genele IL-1 arată că polimorfismul acestora este strâns legat de boala parodontală agresivă.
- ❖ Există o corelație înaltă între profilul genetic al IL-1B, respectiv polimorfismul acestor gene și exprimarea fenotipică, respectiv cantitatea de IL-1beta cuantificată în salivă.
- ❖ Polimorfismul genelor IL-1 se corelează cu statusul clinic și cantitatea de 8-OHdG și IL-1 beta salivare cuantificate.
- ❖ Consecutiv acestor rezultate, putem estima că subiecții sănătoși clinic oro-dentar dar cu polimorfism al genelor IL-1B necesită

monitorizare specială în vederea preîntâmpinării apariției bolii parodontale.

- ❖ Cei doi parametri evaluați cantitativ (IL-1beta și 8-OHdG salivari) prin metoda ELISA reflectă cu un înalt nivel de sensibilitate și specificitate implicarea acestora în boala parodontală agresivă, rezultate ce susțin utilizarea acestor biomarkeri în diagnosticul și monitorizarea bolii parodontale.
- ❖ Estimarea statistică a riscului relativ de progresie a bolii evaluate prin combinarea parametrilor luați în studiu arată că cel mai mare risc relativ este pentru asocierea dintre IL-1beta și prezența speciei bacteriene *A. actinomycetemcomitans*.
- ❖ Cea mai nefastă asociere privind biomarkerii luați în studiu este cea dintre APP și 8-OHdG salivară care duce la o progresie a bolii de 17,41 de ori mai mare la pacienții cu boală parodontală agresivă.
- ❖ Privind corelația dintre adâncimea șanțului gingival și cantitatea de 8-OHdG salivar la sănătoși, susține posibilitatea utilizării acestui biomarker în diagnosticul precoce al bolii parodontale și în vederea realizării screeningului populațional.

REFERINȚE SELECTIVE

1. Dumitriu H.T., Parodontologie, ISBN 973-9320-17-1, Ed. Viata Medicala Romaneasca, Bucuresti, 1998;
3. Carranza F., Carranza's Clinical Periodontology, ISBN: 978-1-4377-0416-7, Elsevier Inc., 2012;
10. Clerehugh V., Kindelan S., Guidelines for periodontal screening and management of children and adolescents under 18 years of age, 2012 British Society of Periodontology and The British Society of Paediatric Dentistry;
11. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs318/en/index.html> citat 22.01.2014
12. http://www.who.int/oral_health/strategies/cont/en/index.html citat 22.01.2014
23. Socransky S.S., Haffajee A.D., Cugini M.A., Smith C., Kent R.L. Microbial complexes in subgingival plaque, Journal of Clinical Periodontology 1998, 25:134–144.
24. Venkataramaiah P.D., Biradar B., Plaque Biofilm, Gingival Diseases – Their Aetiology, Prevention and Treatment, Dr. Fotinos Panagakos (Ed.), ISBN: 978-953-307-376-7, InTech, 2011;
33. Olinescu A., Panait M., Introducere în imunologie, Editura InfoMedica, București, 2004, ISBN 973-7912-22-5, pag 17, 213
38. Nemec A., Petelin M., Pavlica Z., Systemic inflammatory host response to periodontopathogenic bacteria in the oral cavity: from experimental to clinical studies, Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education, Ed. A. Mendez-Vilas, Formatex 2013, pp: 1926-1933
42. Mills M.P., Immunological and Inflammatory aspects of periodontal disease, Curs EMC, Crest Oral-B al dentalcare.com, octombrie 2013, <http://www.dentalcare.com/en-US/dental-education/continuing-education/ce1/ce1.aspx?ModuleName=introduction&PartID=-1&SectionID=-1>, citat 31.07.2014
59. Zia A., Khan S., Bey A., Gupta N.D., Mukhtar-Un-Nisar S., Oral biomarkers in the diagnosis and progression of periodontal diseases, Biology and Medicine, 2011, 3(2) Special Issue:45-52
63. Giannobile W.V., Beikler T., Kinney J.S., Ramseier C.A., Morelli T., Wong D.T., Saliva as a diagnostic tool for periodontal disease: current state and future directions, Periodontology 2000, 2009, 50:52-64
64. Canakci C.F., Canakci V., Tatar A., Eltas A., Sezer U., Cicek Y., Oztas S., Increased salivary level of 8-hydroxydeoxyguanosine is a marker of premature oxidative mitochondrial DNA damage in gingival tissue of patients with periodontitis, Arcj. Immunol. Ther. Exp., 2009, 57:205-211
65. Sezer U., Cicek Y., Canakci C.F., Increased salivary levels of 8-hydroxydeoxyguanosine may be a marker for disease activity for periodontitis, Dis Markers, 2012, 32(3):165-172
66. Sai A., Estimation of 8-ohdg (8-hydroxy-deoxyguanosine) in saliva as a marker of oxidative stress in periodontitis patients, RGUHS Periodontology, 2009, <http://hdl.handle.net/123456789/3405>, citat 18.02.2014

67. Badea V., Grigorian M., Nuca C., Amariei C., Martinescu A., Voineagu L., Study regarding the use of salivary 8-hydroxydeoxyguanosine and Interleukine-1 gene polymorphism – as potential biomarkers in the diagnosis of aggressive periodontitis, *Revista Romana de Medicina de Laborator*, 2013, 21(1):75-82
68. Badea V., Nuca C., Zaharia A., Amariei C., Bucur L.A., Grigorian M., Researches regarding the monitoring complementary treatment in periodontitis by using salivary 8-OhdG biomarker, *Farmacia*, 2013, 61(4):685-693
69. Badea V., Balaban B.P., Amariei C., Nuca C., Bucur L., Salivary 8-hidroxy-2-deoxy guanosine as oxidative stress biomarker for the diagnosis of periodontal disease, *Farmacia*, 2010, 58(5): 660-670
70. Patil P.B., Patil B.R., Saliva: A diagnostic biomarker of periodontal disease, *Journal of Indian Society of Periodontology*, 2011, 15(4):310-317
76. Canakci C.F., Cicek Y., Yildirim A., Sezer U., Canakci V., Increased levels of 8-hydroxydeoxyguanosine and malondialdehyde and its relationship with antioxidant enzymes in saliva of periodontitis patients, *European Journal of Dentistry*, 2009, 3:100-106
77. Iannitti T., Rottigni V., Palmieri B., Role of free radicals and antioxidant defences in oral cavity-related pathologies, *J Oral Pathol Med*, 2012, doi: 10.1111/j.1600-0714.2012.01143.x
88. Kornman K.S., Crane A., Wang H.Y., di Giovine F.S., Newman M.G., Pirk F.W., Wilson Jr.T.G., Higginbottom F.L., Duff G.W., The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease, *J Clin Periodontol*, 1997, 24:72-77
97. Shibani K., Shhab R., Khattab R., Analysis of IL-1 α (-889) and IL-1B (+3953) gene polymorphism in Syrian patients with aggressive periodontitis: A pilot study, *ISRN Dentistry*, 2011, article ID 682564, doi:10.5402/2011/682564
99. Scapoli C., Borzani I., Guarnelli M.E., Mamolini E., Annunziata M., Guida L., Trombelli L., IL-1 gene cluster is not linked to aggressive periodontitis, *Journal of Dental Research*, 2010, 89(5):457-461
101. Jayaraman P., Shendre A.A., Gattani D., Rajput N.S., Genetics and periodontal disease, *Indian Journal of Multidisciplinary Dentistry*, 2013, 3(2):695-699
102. Nuca C., Amariei C., Badea V., Jipa I.T., Study regarding the correlation between the salivary cotinine concentration and the Community Periodontal Index of Treatment Needs in young smokers from Constanta District, *Revista Romana de Medicina de Laborator*, 2010, 18(3): 61-70
103. Nuca C., Amariei C., Badea V., Zaharia A., Bucur L.A., Arendt C., Cotinina salivara - biomarker al consumului de tutun in evaluarea prevalenței fumatului pasiv, *Revista Farmacia*, 2012, 60(5): 662-674
104. Nuca C., Amariei C., Badea V., Jipa I.T., Arendt C., Grigorian M., Nuca A.M., Badea F.C., Plaque, bleeding on probing and calculus in 35 - 44 year-old smokers and non-smokers in Constanta, Romania, *Archives de l'Union Medicale Balkanique*, 2011, 46(3): 208-214
105. Silvestre F.J., Miralles L., Llambes F., Bautista D., Sola-Izquierdo E., Hernandez-Mijares A., Type 1 diabetes mellitus and periodontal disease: Relationship to different clinical variables, *Med Oral Patol Cir Bucal*, 2009, 14(4):E175-9

107. Hain LifeScience, micro-Ident ver 2.0, Molecular Genetic Assay for Combined Indentification of Five Periodontopathogenic Bacterial Species
108. Hain LifeScience, GenoType IL-1 ver 1.0, Molecular Genetic Assay for combined detection of the IL-1A -889, IL-1B +3953, and IL-1RN +2018 Polymorphisms of the Interleukin-1 Gene Cluster
109. Promokine, Human IL-1 beta ELISA kit, Instruction Manual
110. Cayman Chemical, DNA/RNA Oxidative Damage EIA Kit
117. Yacoubi A., Djamila B., Makhrelouf L., Bensoltane A., Microbiological Study of Periodontitis in the West of Algeria, World Journal of Medical Sciences, 2010, 5(1):07-12
118. Advances in the Microbiology of Aggressive Periodontitis, <http://perioatuit.com/2013/08/11/advances-in-the-microbiology-of-aggressive-periodontitis/>, citat 31.08.2014
119. Mythireyi D., Krishnababa M.G., Aggregatibacter Actinomycetemcomitans, an Aggressive Oral Bacteria - A Review, International Journal of Health Sciences & Research, 2012, 2(5):105-117
121. Tomita S., Komiya-Ito A., Imamura K., Kita D, Ota K., Takayama S., Makino-Oi A., Kinumatsu T., Ota M., Saito A., Prevalence of Aggregatibacter actinomycetemcomitans, Porphyromonas gingivalis and Tannerella forsythia in Japanese patients with generalized chronic and aggressive periodontitis, Microbial Pathogenesis, 2013, 61-62:11-15
123. Wang X., Li L., Yang M., Geng Y., Chen H., Xu Y., Sun Y., Prevalence and distribution of Aggregatibacter actinomycetemcomitans and its cdtB gene in subgingival plaque of Chinese periodontitis patients, BMC Oral Health, 2014, 14:37, <http://www.biomedcentral.com/1472-6831/14/37>, citat 15.08.2014
125. Könönen E., Müller HP., Microbiology of aggressive periodontitis, Periodontol 2000, 2014, 65(1):46-78
126. Yucel O.O., Berker E., Mescil L., Eratalay K., Tepe E., Tezcan I., Association of interleukin-1 beta (+3954) gene polymorphism and gingival crevicular fluid levels in patients with aggressive and chronic periodontitis, Genet Couns, 2013, 24(1):21-35
127. Ertugrul A.S., Sahin H., Dikilitas A., Aplaslan N., Bozoglan A., Compariosn of CCL28, interleukin-8, interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis, J Periodontal Res., 2013, 48(1):44-51
128. Yue Y., Liu Q., Xu C. et all., Comparative evaluation of cytokines in gingival crevicular fluid and saliva of patients with aggressive periodontitis, Int J Biol Markers, 2013, 28(1):108-112
129. Wang W.-F., Shi J., Chen S.-J., Niu Y.-M., Zeng X.-T., Interleukin-1 α -889(+4845) C-T polymorphism is not associated with aggressive periodontitis susceptibility: A meta-analysis based on 19 case-control studies, Biomedical Reports, 2014, 2:378-383
132. Safonova A.V., Petrin A.N., Arutyunov S.D., Tsarev V.N., Akulenko L.A., Zorina A.O., Rebrikov D.V., Rubanovich A.V., Borinskaya S.A., Yankovsky N.K.,

- Association of cytokine gene alleles with the inflammation of human periodontal tissue, *Acta naturae*, 2011, 3(1):116-122
134. Gandhi M., Kothiwale S., Association of periodontal Diseases with Genetic Polymorphisms, *International Journal of Genetic Engineering*, 2012, 2(3):19-27
 135. Guzeldemir E., Gunhan M., Ozcelik O., Tastan H., Interleukin-1 and tumor necrosis factor- α gene polymorphisms in Turkish patients with localized aggressive periodontitis, *Journal of Oral Science*, 2008, 50(2):151-159
 136. Quappe L., Jara L., Lopez N.J., Association of interleukin-1 polymorphisms with aggressive periodontitis, *Journal of Periodontology*, 2004, 75(11):1509-1515
 137. Havemose-Poulsen A., Sorensen L.K., Bendtzen K., Holmstrup P., Polymorphisms within the IL-1 gene cluster: effects on cytokine profiles in peripheral blood and whole blood cell cultures of patients with aggressive periodontitis, juvenile idiopathic arthritis, and rheumatoid arthritis, *Journal of Periodontology*, 2007, 78(3):475-492
 138. Parkhill J.M., Henning B.J., Chapple I.L., Heasman P.A., Taylor J.J., Association of IL-1 gene polymorphism with early-onset periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*. 2000, 27(9):682-689.
 139. Fiebig A., Jepsen S., Loos B.G. et al., Polymorphisms in the interleukin-1 (IL1) gene cluster are not associated with aggressive periodontitis in a large Caucasian population, *Genomics*, 2008, 92(5):309–315
 140. Scapoli C., Mamolini E., Carrieri A., Guarnelli M.E., Annunziata M., Guida L., Romano F., Aimetti M., Trombelli L., Gene-gene interaction among cytokine polymorphisms influence susceptibility to aggressive periodontitis, *Genes Immun.*, 2011, 12(6):473-480
 141. Drozdik A., Kurzawski M., Safronow K., Banach J., Polymorphism in interleukin-1 β gene and the risk of periodontitis in a Polish population, *Advances in Medical Sciences*, 2006, 51(Suppl.1):13-17
 142. Schulz S., Stein J., Altermann W., Klapproth J., Zimmermann U., Reichert Y., Glaser C., Schaller H.-G., Reichert S., Single nucleotide polymorphisms in interleukin-1 gene cluster and subgingival colonization with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in patients with aggressive periodontitis, *Human Immunology*, 2011, 72:940-946
 143. Arab H.R., Tavakkol-Afshari J., Radvar M., Moeintaghavi A., Sargolzaei N., Rigi A., Shirkhani M., IL-1 β +3954 genetic polymorphism association with generalized aggressive periodontitis in Khorasan-Iran province, *J.Med.Sci.*, 2007, 7(2):222-227
 144. Scapoli L., Girardi A., Palmieri A., Carinci F., Testori T., Zuffetti F., Monguzzi R., Lauritano D., IL6 and IL10 are genetic susceptibility factors of periodontal disease, *Dental Research Journal*, 2012, 9(8, Suppl. 2):S197-201
 145. Ebadian A.R., Radvar M., Afshari J.T., Sargolzaei N., Brook A., Ganjali R., Tamizi M., Arab H.R., Gene polymorphisms of TNF- α and IL-1 β are not associated with generalized aggressive periodontitis in an Iranian subpopulation, *Iran J Allergy Asthma Immunol*, 2013, 12(4):345-351
 146. Takane M., Sugano N., Ezawa T., Uchiyama T., Ito K., A marker of oxidative stress in saliva: association with periodontally-involved teeth of a hopeless prognosis, *Journal of Oral Science*, 2005, 47:1, 53-57.

LISTĂ CU LUCRĂRILE PUBLICATE DIN DOMENIUL TEZEI DE DOCTORAT

ARTICOLE PUBLICATE IN REVISTE COTATE ISI

1. “Study regarding the use of salivary 8-hydroxydeoxyguanosine and Interleukine-1 gene polymorphism – as potential biomarkers in the diagnosis of aggressive periodontitis”, Badea Victoria, **GRIGORIAN MIRCEA**, Nuca Cristina, Amariei Corneliu, Martinescu Alina, Voineagu Lavinia, Revista Romana de Medicina de Laborator, Vol 21, Nr 1/4, Martie 2013, revista ISI cu factor de impact 0,113 in 2010, pp. 75-82
2. “Researches regarding the monitoring complementary treatment in periodontitis by using salivary 8-OHdG biomarker”, Victoria Badea, Cristina Nuca, Corneliu Amariei, Agripina Zaharia, Laura Adriana Bucur, **MIRCEA GRIGORIAN**, Farmacia, Nr. 4, 2013, revistă ISI cu factor de impact 0,669 in 2011, pp. 685-693

ARTICOLE ISI PROCEEDINGS

3. “The relationship between salivary secreotry Immunoglobulin A and 8-Hidorxy-2-Deoxy Guoanosine in periodontitis”, **MIRCEA GRIGORIAN**, Cristina Nuca, Doina Paula Balaban, Florin Ciprian Badea, Aureliana Caraiane, Victoria Badea, SGEM Conference on Psychology&Psychiatry Sociology&Healthcare Education, Conference Proceeding, Volume II, Sociology and Healthcare, ISBN 978-619-7105-23-0, ISSN 2367-5659, Septembrie 2014, pp. 1081-1088

ARTICOLE PUBLICATE ÎN REVISTE COTATE BDI

4. “Salivary Interleukin-1 and 8-Hidroxydeoxyguanosine and their relation with the periodontal status”, Aureliana Caraiane, Victoria Badea, Florin Ciprian Badea, **MIRCEA GRIGORIAN**, Romanian Journal of Oral Rehabilitation, Vol. 6, Nr. 2, Aprilie-Iunie 2014, pp. 8-13
5. “Secretory immunoglobulin A and Interleukin 1 – Markers used in the diagnosis of periodontal disease”, Caraiane Aureliana, Victoria Badea, Cristina Nuca, Florin Ciprian Badea, **MIRCEA GRIGORIAN**, Romanian Journal of Oral Rehabilitation, Vol. 6, Nr. 1, Ianuarie-Martie 2014, pp. 89-94
6. “Polymerase Chain Reaction used as a modern method for identification of bacterial species involved in aggressive periodontitis”, **MIRCEA GRIGORIAN**, Victoria Badea, Cristina Nuca, Lucian Petcu, Alina Martinescu, Analele Universității ”Dunărea de Jos” Galați Medicină, Fascicula XVII, Nr. 2, pp. 73-78, Ianuarie 2013

POSTERE CU REZUMAT PUBLICAT IN REVISTE COTATE ISI

7. “Study on IL-1A gene polymorphism and biomarkers of oxidative stress in aggressive periodontal disease”, **MIRCEA GRIGORIAN**, Cristina Nuca, Alina Martinescu, Lucian Petcu, Aureliana Caraiane, Ciprian-Florin Badea, Anca Pavalache, Gabriela Gegiu, Victoria Badea, 8th Conference of the Romanian Association of Medical Laboratories with international participation, 28-31 mai 2014, Sibiu, Romania România - poster cu rezumat publicat în revista ISI cu factor de impact 0,113 in 2010 - Romanian Review of Laboratory Medicine, Supliment la Vol. 22, Nr. 1, Martie 2014;

8. “The identification of *Prevotella intermedia* in the aggressive periodontitis by polymerase chain reaction”, **MIRCEA GRIGORIAN**, Cristina Nuca, Victoria Badea, Alina Martinescu, Lucian Petcu, Andrei Dan Branza, Alin Odor, Anca Pavalache, Aureliana Caraiane, 8th Conference of the Romanian Association of Medical Laboratories with international participation, 28-31 mai 2014, Sibiu, Romania România - poster cu rezumat publicat în revista ISI cu factor de impact 0,113 in 2010 - Romanian Review of Laboratory Medicine, Supliment la Vol. 22, Nr. 1, Martie 2014;
9. “Periodontopathogenic bacteria involved in periodontal disease identified by molecular methods”, **GRIGORIAN MIRCEA**, Nuca Cristina, Martinescu Alina, Petcu Lucian, Caraiane Aureliana, Sachir Erdogan, Branza Andrei Dan, Badea Victoria, 2nd Congress of the Romanian Association of Medical Laboratories, 5-8 iunie 2013, Brasov, România - poster cu rezumat publicat în revista ISI cu factor de impact 0,113 in 2010 - Romanian Review of Laboratory Medicine, Supliment la Vol. 21, Nr. 2/4, Iunie 2013;
10. „Study regarding interleukine-1 gene polymorphism – as a potential biomarker in periodontitis disease”, Badea Victoria, **GRIGORIAN MIRCEA**, Nucă Cristina, Badea Florin Ciprian, Nucă Alexandra Maria, 7th Conference of the Romanian Association of Medical Laboratories, 20-23 iunie 2012, Sinaia, România - poster cu rezumat publicat în revista ISI fără scor relativ de influență calculat - Romanian Review of Laboratory Medicine, Supliment Vol. 20, Nr. 2/4, Iunie 2012;
11. „Salivary 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) biomarker and its application in periodontitis diagnosis”, Badea Victoria, Nuca Cristina, Balaban Doina, **GRIGORIAN MIRCEA**, Arendt Cristina, Sapira Violeta, 6th conference of the Romanian Association of Medical Laboratories, 1-4 iunie 2011, Piatra Neamț, România - poster cu rezumat publicat în revistă ISI - Romanian Review of Laboratory Medicine, Supliment Vol. 19, Nr. 2/4, Iunie 2011;

POSTERE/PREZENTARI ORALE CU REZUMAT PUBLICAT IN VOLUMUL DE REZUMATE AL CONFERINTELOR

12. “The use of bacteria identification by Polymerase Chain Reaction in periodontitis disease”, **M. GRIGORIAN**, Mihaela Hincu, Cristina Nuca, Alina Martinescu, L. Petcu, Victoria Badea, XI-lea Simpozion National de Morfologie Microscopica cu participare internationala, 22-24 mai 2013, Craiova, Romania – poster cu rezumat publicat in volum ISBN 978-606-11-3432-8
13. “Association of interleukin-1 gene polymorphism and susceptibility to aggressive periodontitis developed by polymerase chain reaction (PCR)”, V. Badea, C. Nuca, **M. GRIGORIAN**, D. Balaban, F. Badea, European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 27-30 Aprilie 2013, Berlin, Germania – poster cu rezumat publicat.
14. „News regarding the use of Interleukin-1 Beta in the periodontitis diagnosis”, **GRIGORIAN MIRCEA**, Badea Victoria, Nuca Cristina, Martinescu Alina, The Xth International Congress of Oro-Dental Health and Management in the Black Sea Euro-Region, 23-25 Mai 2012, Constanta, România - prezentare orală cu rezumat publicat;

15. “Salivary biomarkers as a monitoring tool of oral oxidative stress”, Doina Paula Balaban, Lucian Petcu, Victoria Badea, Florica Busuricu, **MIRCEA GRIGORIAN**, Gabriela Ciobanu, Second International Conference Analytical and Nanoanalytical Methods for Biomedical and Environmental Sciences IC-ANMBES 2012, 24-27 Mai 2012, Brasov – poster cu rezumat publicat;
16. „The study of the potential association between IL-1 gene polymorphism and aggressive periodontitis in Romanian population”, Victoria Badea, Corneliu Amariei, Cristina Nuca, **MIRCEA GRIGORIAN**, Alina Martinescu, Radu Zaharia, Florin Ciprian Badea, FDI Annual World Dental Congress, 14-17 Septembrie 2011, Mexico City – poster cu rezumat publicat;
17. „The relationship between salivary 8-OHdG biomarker and clinic periodontal status”, Victoria Badea, Cristina Nuca, Corneliu Amariei, **MIRCEA GRIGORIAN**, 16th Annual Meeting of European Association of Dental Public Health, 22-24 Septembrie 2011, Roma – poster cu rezumat publicat;
18. „The use of salivary 8-OHdG biomarker in prevention of periodontitis”, Victoria Badea, Corneliu Amariei, Cristina Nuca, **MIRCEA GRIGORIAN**, Cristina Arendt, 16th Congress of the Balkan Stomatological Society, 28 Aprilie - 1 Mai 2011, Bucuresti – poster cu rezumat publicat;

PREZENTARE ORALA FARA REZUMAT PUBLICAT

19. „Diagnosticul molecular in boala parodontala”, Martinescu Alina, **GRIGORIAN MIRCEA**, Badea Victoria, Nuca Cristina, Petcu Lucian, A XXIVa Sesiunea de comunicari stiintifice, Universitatea Ovidius din Constanta, Facultatea de Medicina, 4-5 Aprilie, 2014

MEMBRU IN PROIECT DE CERCETARE IN TEMA TEZEI

20. „Studii privind determinarea 8-hidroxideoxiguanozină salivară – biomarker de stress oxidativ, în vederea utilizării ca metodă de screening și monitorizare a bolii parodontale” – proiect CNCSIS-UEFISCSU PNII-IDEI 1217/2008, perioada de desfășurare 2009-2011, membru în proiect din 01 martie 2011;