

UNIVERSITATEA "OVIDIUS" DIN CONSTANȚA

ȘCOALA DOCTORALĂ DE MEDICINĂ
DOMENIUL DE DOCTORAT MEDICINĂ DENTARĂ

TEZĂ DE DOCTORAT

REZUMAT

**CONTRIBUȚII PRIVIND STUDIUL ANTIMICROBIAN AL
EXTRACTULUI APOS DE *PRUNUS SPINOSA L.* ÎN CADRUL
AFECȚIUNILOR ORODENTARE**

Conducător de doctorat

Prof. univ. dr. BADEA VICTORIA

Student - doctorand

GEGIU GABRIELA

CONSTANȚA, 2015

CUPRINS

PARTEA GENERALĂ

INTRODUCERE

CAP. 1 STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

1.1 DATE BOTANICE DESPRE SPECIA *PRUNUS SPINOSA* L.

1.1.1 Denumiri

1.1.2 Încadrare sistematică

1.1.3 Caractere morfologice ale speciei *Prunus spinosa* L.

1.1.3.1 Caractere macroscopice

1.1.4 Date privind ecologia și recoltarea speciei *Prunus spinosa* L.

1.2 DATE FITOCHIMICE PRIVIND CONȚINUTUL ÎN PRINCIPALII CONSTITUENȚI AI SPECIEI *PRUNUS SPINOSA* L.

1.2.1 Taninuri

1.2.2 Acidul galic

1.2.3 Acidul cafeic

1.2.4 Acidul clorogenic

1.3 IMPORTANȚA VALORIFICĂRII PLANTELOR MEDICINALE

1.3.1 Acțiunea antibacteriană și antifungică a plantelor medicinale

1.3.2 Utilizarea în practica medicală a speciei *Prunus spinosa* L.

1.3.3 Plantele medicinale– posibilă soluție privind rezolvarea problemei rezistenței la antibiotice

1.4 TEHNICI MODERNE DE ANALIZĂ FOLOSITE ÎN STUDIUL COMPUȘILOR DIN PLANTE MEDICINALE

1.4.1 CROMATOGRAFIA DE LICHIDE DE ÎNALTĂ PERFORMANȚĂ (HPLC)

1.4.2 METODA DE DETERMINARE A CAPACITĂȚII DE SCAVENGER DPPH (DIFENILPICRILHIDRAZIL)

CAP. 2 STRESUL OXIDATIV

2.1 Definiție

2.2 Specii reactive de oxigen și azot – clasificare și modalități de formare

2.3.1 Antioxidanți. Clasificare

2.3.2 Antioxidanți. Proprietăți

2.4 Implicațiile stresului oxidativ în inițierea și evoluția unor afecțiuni

2.5 Corelația fumat - stres oxidativ

2.6 Cotinina salivară - biomarker de stres oxidativ în cavitatea orodentară

CAP. 3 BOALA PARODONTALĂ

3.1 Definiție

3.1.2 Clasificare

3.1.3 Etiopatogenie

3.2 Utilizarea biomarkerilor în diagnosticul și în monitorizarea bolii parodontale

CAP. 4 INTERLEUKINE

4.1 Definiție

4.2 Clasificare

4.3 Interleukina 6 – biomarker în boala parodontală

PARTEA PERSONALĂ

CAP. 5 STUDIUL I - ANALIZA FARMACOGNOSTICĂ A PRODUSULUI VEGETAL OBȚINUT DIN FRUCTELE SPECIEI *PRUNUS SPINOSA* L.

5.1 Introducere

5.2 Ipoteza de lucru

5.3 Material și metodă

5.4 Rezultate

5.5 Discuții

5.6 Concluzii preliminare

CAP. 6 STUDIUL II – STUDII PRIVIND EFECTELE ANTIBACTERIENE SI ANTIFUNGICE ALE EXTRACTULUI APOS DE *PRUNUS SPINOSA* L.

6.1 Introducere

6.2 Ipoteza de lucru

6.3 Material și metodă

6.4 Rezultate

6.5 Discuții

6.6 Concluzii preliminare

ANALIZA STATISTICĂ

CAP. 7 STUDIUL III - EFECTUL ANTIOXIDANT AL SOLUȚIEI APOASE DE *PRUNUS SPINOSA* L. EVALUAT PRIN BIOMARKERII COTININĂ SALIVARĂ ȘI IL-6

7.1 Introducere

7.2 Ipoteza de lucru

7.3 Material și metodă

7.4 Rezultate

7.5 Discuții

7.6 Concluzii preliminare

CAP. 8 ORIGINALITATEA ȘI CONTRIBUȚIILE INOVATOARE ALE TEZEI

CAP. 9 CONCLUZII GENERALE

REFERINȚE

INDEX DE FIGURI ÎN TEXT

INDEX DE TABELE ÎN TEXT

INDEX DE GRAFICE ÎN TEXT

LISTA CU ABREVIERILE FOLOSITE ÎN CADRUL TEZEI DE DOCTORAT

LISTA CU LUCRĂRILE PUBLICATE DIN DOMENIUL TEZEI DE DOCTORAT

Cuvinte cheie: extract apos, *Prunus spinosa* L., activitate antibacteriană, boală parodontală, biomarkeri salivari, cotinină salivară, IL-6 salivară

INTRODUCERE

În ultimii ani s-a observat o tendință de înlocuire a medicamentelor cu remedii naturale, deoarece s-au constatat o multitudine de efecte adverse ale medicamentelor. Dacă efectul remediilor naturale este același cu cel al medicamentelor, trebuie aleasă calea cea mai puțin nocivă.

Plantele medicinale cu acțiune antibacteriană ar putea reprezenta o sursă importantă de compuși bioactivi, care prin synergism cu medicamentele antibacteriene deja cunoscute, ar putea fi exploatate în terapii combinate.

În ultimele decenii, apariția rezistenței la antibiotice ne-a determinat să căutăm agenți antibacterieni noi și eficienți. Pentru a combate microorganismele multirezistente la antibiotice, oamenii de știință studiază mecanismele de apariție a rezistenței la antibiotice, dar și noile posibilități privind dezvoltarea de medicamente naturale alternative .

Multe plante aromatice au proprietăți antioxidante, mai ales datorită conținutului de compuși fenolici. Compușii din aceste plante sunt utili ca agenți terapeutici alternativi sau ca modele pentru noile substanțe sintetice. Compușii fenolici (flavonoide, acizi fenolici, antocianine, stilbene, taninuri, lignani și lignine) sunt importanți pentru creșterea și dezvoltarea normală a plantelor, precum și pentru dezvoltarea abilităților de apărare împotriva stresului oxidativ.

Stresul oxidativ este indus de o serie de factori de mediu (raze UV, agenți patogeni, poluare), factori dietetici și medicamentoși și este implicat în dezvoltarea a peste 200 de boli printre care ateroscleroza, insuficiența cardiacă, boala Parkinson, boala Alzheimer, infarctul miocardic, cancerul și boala parodontală.

Boala parodontală afectează aproximativ 70% din populația țărilor dezvoltate și mai puțin dezvoltate și este definită ca fiind o afecțiune cronică de tip inflamator, cu manifestări la nivelul țesuturilor de susținere ale dintelui (gingie, ligament parodontal, os alveolar). Boala parodontală este o boală multifactorială în care acțiunea bacteriilor ce formează placa dentară dar și asocierea acestora cu factori genetici au importanță deosebită în apariția și progresia acestei boli.

Au fost identificate peste 700 specii bacteriene în placa subgingivală, unele dintre ele devenind agenți etiologici în boala parodontală sub influența factorilor locali sau sistemici. Cele mai frecvent implicate specii bacteriene sunt: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* și *Treponema denticola*.

Deoarece specia *Prunus spinosa* L. este regăsită în flora foarte multor țări și este utilizată pentru acțiunile ei farmacologice, am ales pentru efectuarea studiilor fructele uscate ale speciei recoltate din județul Tulcea.

Pornind de la toate aceste considerente, a apărut ideea prezentei teze în care am dorit să evidențiez o posibilă corelație între acțiunile antibacteriene și antioxidante ale speciei *Prunus spinosa* L. și statusul orodentar normal și patologic.

CAPITOLUL 1. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Prunus spinosa L. este un arbust indigen, întâlnit în toate regiunile țării, de la câmpie până la munte, atât pe stânci cât și pe dealuri pietroase și coaste însorite [1].

Componentele esențiale ale fructelor sunt reprezentate de oze, acizi organici, vitamina C, polifenoli, taninuri, flavonozide, antocianozide, heterozide cianogene, carotenoide, gumirezine și săruri de Ca și Mg [1,14,15,16]. Polifenolii sunt antioxidanți cu proprietăți redox, ceea ce le permite să acționeze ca agenți de reducere, donatori de hidrogen și ca oxigen singlet de saturare. Unii polifenoli prezintă proprietăți de chelatare a metalelor, iar alții au activitate antimicrobiană [33].

Dat fiind cunoscut stadiul actual al rezistenței la antibiotice și trendul ascendent al acesteia, se impune identificarea unor compuși antibacterieni eficienți noi, prin investigarea aprofundată la nivel global a extractelor pe bază de plante și prin studierea activităților antibacteriene, antifungice și antivirale ale acestora.

Plantele ca viitoare surse de obținere de medicamente sunt menționate și în documentele OMS, dat fiind faptul că există posibilitatea ca unii produși din plante să fie utilizați pentru dezvoltarea unor agenți antibacterieni [12].

Pe baza compoziției chimice a fructelor speciei *Prunus spinosa* L. și a datelor din literatura de specialitate privind acțiunea antibacteriană, utilizarea lor ca alternativă la tratamentul cu antibiotice presupune un studiu aprofundat.

CAPITOLUL 2. STRESUL OXIDATIV

Organismul uman produce radicali liberi în mod fiziologic, aceștia fiind responsabili pentru îmbătrânirea celulară, iar atunci când sunt produși în cantități foarte mari intervin în dezvoltarea bolilor. Astfel, se estimează că peste 200 de boli, printre care ateroscleroza, bolile cardiovasculare, diabetul, obezitatea, cancerul și boala parodontală, sunt datorate stresului oxidativ [30, 66].

Din categoria surselor exogene care induc formarea speciilor reactive de oxigen se menționează alimentația nerațională, abuzul de alcool, expunerea la fumul de țigară, poluarea atmosferică, radiațiile UV, precum și administrarea unor medicamente.

Expunerea la fumul de țigară, în cazul unor afecțiuni orale așa cum este boala parodontală, este asociată cu creșterea peroxidării lipidelor; prin urmare, se poate sugera că efectele oxidative în boala parodontală sunt agravate de efectele fumatului [61]. Se apreciază că un biomarker pentru evaluarea fumatului este cotinina, principalul metabolit al nicotinei [79]. Cotinina salivară este corelată cu expunerea recentă la nicotină (3-4 zile), cu statutul de fumător (constant activ sau fumător ocazional, fumător pasiv, nefumător) și cu nivelurile de cotinină din plasmă și urină[73].

Din cauza posibilităților limitate de diagnostic a bolii parodontale (clinice și radiologice), utilizarea biomarkerilor din fluidele orale reprezintă o modalitate prin care se pot optimiza atât diagnosticul cât și monitorizarea bolii parodontale [72].

CAPITOLUL 3. BOALA PARODONTALĂ

Conform Organizației Mondiale a Sănătății (OMS), boala parodontală este identificată în prezent la 5-20% dintre adulții de vârstă mijlocie din întreaga lume.

Caracteristica bolii parodontale cronice este reprezentată de adâncimea pungii parodontale care creează un mediu favorabil pentru dezvoltarea microorganismelor anaerobe și aerobe facultativ anaerobe; în pungile parodontale active se dezvoltă *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum* și *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Alături de *Aggregatibacter*

actinomyces comitans în boala parodontală agresivă se regăsesc *Capnocytophaga spp.* și *Porphyromonas gingivalis* [82].

Socransky, ținând cont de gradul de patogenitate al speciilor microbiene implicate în boala parodontală, le-a clasificat în “complexe bacteriene”. De cele mai multe ori, aceste specii bacteriene se asociază determinând în final particularitățile specifice bolilor parodontale [86].

Mai multe tipuri de biomarkeri au fost asociate cu bolile sistemice și cu bolile cavității orale, dat fiind faptul că ei pot fi detectați în salivă și în fluidul crevicular [90]. Acești biomarkeri sunt reprezentați de interleukina-1 β , interleukina-6 și interleukina-8, factorul de necroză tumorală- α (TNF- α), etc.

CAPITOLUL 4. INTERLEUKINE

Capacitatea de apărare a sistemului imunitar depinde de capacitatea celulelor de a comunica unele cu altele prin contact direct celulă-celulă sau prin secretarea unor proteine mici de semnalizare numite citokine [86]. În funcție de rolurile și acțiunile lor, citokinele sunt împărțite în: interleukine (IL), factori de necroză tumorală (TNF- α , TNF- β), interferoni (IFN), factori de stimulare a coloniilor (C-CSF), chemokine și factori de creștere (GF-Growth Factors) [94]. IL-6 este o interleukină cu funcții pleiotrope implicată în reglarea răspunsului imun, al răspunsului de fază acută, al hematopoiezei și al inflamației. Este secretată de limfocitele B și T activate, de granulocitele PMN, macrofage, fibroblaști, osteocite, monocite, mastocite, keratinocite și chiar de celulele neoplazice [100].

Având funcții biologice variate, este implicată în proliferarea normală sau patologică a unor celule (trombocite, keratinocite, limfocite B) fiind responsabilă de apariția unor boli. Este secretată în cantități mari în mielomul multiplu sau în cancerul de rinichi; induce producerea febrei care poate fi blocată de inhibitorii ciclooxygenazei și este implicată în diferențierea neuronilor. De asemenea, s-a demonstrat că nivelul seric al IL-6 este crescut în psoriasis, artrită reumatoidă, ciroză hepatică, limfoame, glomerulonefrită proliferativă mezangială și carcinoame [94].

Studiile de specialitate au demonstrat prezența unui nivel crescut al IL-6, IL-8 și al TNF- α în condițiile existenței unei inflamații cronice a gingiei, precum și în fluidul crevicular la subiecții cu boală parodontală [103]. Asocierea dintre aceste substanțe și parametri clinici în gingivită și în boala parodontală, permite aprecierea ca IL-6, IL-8 și TNF- α ar putea fi utilizate ca biomarkeri în evaluarea acestor tipuri de afecțiuni.

CAPITOLUL 5. STUDIUL I - ANALIZA FARMACOGNOSTICĂ A PRODUSULUI VEGETAL OBȚINUT DIN FRUCTELE SPECIEI *PRUNUS SPINOSA* L.

5.1 Introducere

Cercetarea s-a bazat pe caracterizarea chimică și biologică a fructelor uscate ale speciei *Prunus spinosa* L. recoltate din județul Tulcea. De asemenea, compușii identificați au fost analizați și dintr-un preparat farmaceutic cunoscut pentru utilizarea largă – soluția apoasă.

5.2 Ipoteza de lucru

Ipoteza de lucru a fost obținerea unor soluții apoase din fructele uscate ale speciei *Prunus spinosa* L. care ar permite determinarea activității antioxidante a acestei specii și de asemenea evidențierea unei potențiale corelații între conținutul polifenolilor și activitatea antioxidantă a speciei studiate.

5.3 Material și metodă

Metodologia generală a cuprins explicarea metodelor de lucru și a principiilor de utilizare caracteristice plantelor medicinale conform monografiei din Farmacopeea Româna ediția a X-a (F.R. X)[106] și din Farmacopeea Europeană ediția a III-a (E.P. 3.0) [108].

Separarea, identificarea și cuantificarea compușilor fenolici s-a realizat printr-o metodă HPLC standardizată pentru determinarea polifenolilor totali, conform monografiei USP 30-NF25.

Metoda DPPH s-a realizat prin măsurarea capacității de neutralizare a radicalului difenilpicrilhidrazil (DPPH), respectiv de transformare a acestuia în forma sa redusă, de către soluțiile analizate.

Materialele luate în studiu au fost reprezentate atât de pulberea obținută din fructele uscate ale speciei *Prunus spinosa* L., cât și de soluția apoasă.

5.4 Rezultate

Examinarea microscopică a pulberii vegetale a permis observarea următoarelor elemente: sclereide, druze de oxalat de calciu, epicarp cu celule ordonate, mezocarp (celule sparte), vase punctate și reticulate.

Prezența acestor elemente microscopice este comună pulberilor de produse vegetale tip fruct. Dacă fructele sunt colorate în celulele de epicarp, poate fi observat pigmentul care dă culoare fructului.

Conform prevederilor din FR X, produsul vegetal nu a prezentat impurități din aceeași plantă (codițe, fragmente de ramuri sau endocarp dur) și nici corpuri străine de planta producătoare (fructele altei specii sau impurități mecanice), astfel încât putem spune că produsul a avut puritate de 100%.

În urma determinării pierderii prin uscare la etuvă, s-au obținut valori aproximativ egale cu 11.27% pentru produsul vegetal reprezentat de pulpă obținută de la fructele speciei *Prunus spinosa* L. Aceste valori s-au apropiat de limitele prevăzute de literatura de specialitate de 12-20% pentru tipul de organ *fructus*.

Conținutul în substanțe solubile în apă din 100 g de produs vegetal (g%) obținut în urma determinării a fost de aproximativ 58.43%.

Din rezultatele determinărilor efectuate putem spune că principiile active solubile în apă au fost în cantitate suficient de mare pentru a justifica utilizarea apei ca solvent la obținerea soluțiilor extractive.

Cantitatea de polifenoli totali pusă în evidență în specia *Prunus spinosa* L. a fost de 6.95 g%, iar cea de taninuri a fost de 3.38 g%. Rezultatele obținute au atestat că produsul vegetal se încadrează în prevederile Farmacopeei Europene ediția 3.0 [108].

În urma analizei HPLC, dintre picurile separate, care apar frecvent în probele de analizat, s-au identificat în concentrații diferite: acidul clorogenic, acidul cafeic și acidul galic. Toți compușii decelați prin metoda HPLC sunt recunoscuți pentru proprietăți antioxidante și antimicrobiene [21,24,25,32].

Extractul apos obținut din fructele recoltate din județul Tulcea a avut capacitatea de scavenger de radical DPPH mare (87.30%), care s-a putut compara cu capacitatea de scavenger a standardului cu concentrații cuprinse între 2.5-20 mg/ml, de 93.56-95.60%.

Prezența în produsul vegetal *fructus* a unor grupe de principii active, ne-a permis să apreciem că fructele uscate ale speciei *Prunus spinosa* L. recoltate din județul Tulcea, ar putea să prezinte interes privind valorificarea din punct de vedere terapeutic.

5.5 Discuții

În cadrul unor studii similare efectuate de Veličković și colaboratorii pe specia *Prunus spinosa* L., nu a fost decelată prezența acidului cafeic, pe care l-am identificat în cadrul prezentului studiu [18]. Studii efectuate de Rodríguez și colaboratorii pe specia *Prunus spinosa* L. au relevat prezența unor concentrații foarte mari de acid galic (430.38-985.56)[109], comparativ cu cele găsite în cadrul prezentului studiu (81.46). Radovanović și colaboratorii au identificat pentru aceleași tipuri de extracte, prin metoda HPLC, și alte tipuri de principii active: acidul sirginic și acidul p-cumarinic [19]; acidul galic a fost identificat în cadrul studiului lui Radovanović într-o concentrație mai mare (150.21), comparativ cu cea găsită în prezentul studiu (81.46), în timp ce acidul cafeic a prezentat o concentrație mai scăzută în cadrul studiului aceluiași autor (0.34).

Apreciem că aceste concentrații diferite ale polifenolilor identificați în diferite studii pe aceeași specie, dar din diferite regiuni ale lumii, se datorează unei posibile interacțiuni între soluri-temperaturi-precipitații-plante. Activitatea antioxidantă determinată prin metoda DPPH a fost studiată pentru specia *Prunus spinosa* L. de mai mulți autori. Rezultate similare cu cele obținute în acest studiu au fost prezentate în literatura de specialitate de către Veličković și colaboratorii, care au identificat o valoare a activității antioxidante cuprinse între 32.05 și 89.10% [18].

De asemenea, Radovanović și colaboratorii au determinat pentru extractul *Prunus spinosa* L. prin aceeași metodă, o capacitate de scavenger de radicali liberi mult mai mică decât cea din prezentul studiu, respectiv 27.06% [19].

Proprietățile antioxidante apreciate prin evaluarea capacității de scavenger de radicali DPPH se corelează cu conținutul în polifenoli, care poate varia în funcție de momentul recoltării, datorită condițiilor pedoclimatice anuale diferite.

5.6 Concluzii preliminare

1. Existența taninurilor în compoziția fructelor uscate ale speciei *Prunus spinosa* L. recoltate din județul Tulcea poate justifica studierea în continuare a materialului vegetal pentru evaluarea proprietăților antibacteriene.
2. Prezența polifenolilor în pulpa fructelor speciei *Prunus spinosa* L. explică proprietățile antioxidante demonstrate și susține posibilitatea utilizării acestor principii active în cadrul unor afecțiuni generate de prezența radicalilor liberi.
3. Estimez faptul că pot exista variabilități ale conținutului în polifenoli totali, respectiv în taninuri al fructelor speciei *Prunus spinosa* L. recoltate din județul Tulcea în funcție de condițiile pedoclimatice.

CAPITOLUL 6. STUDIUL II – STUDII PRIVIND EFECTELE ANTIBACTERIENE ȘI ANTIFUNGICE ALE EXTRACTULUI APOS DE *PRUNUS SPINOSA* L.

6.1 Introducere

Dat fiind faptul că a fost evaluată și cuantificată prezența unor principii active cu potențial antibacterian și antioxidant, studiul II a fost orientat spre evaluarea acestor posibile efecte pe diferite specii bacteriene și fungice.

6.2 Ipoteza de lucru

Am pornit de la premiza existenței unor posibile efecte antibacteriene și antifungice ale extractelor apoase obținute din pulberea fructelor uscate ale speciei *Prunus spinosa* L. recoltate din județul Tulcea; în cazul existenței acestor efecte se va evalua nivelul de eficiență antibacteriană și antifungică prin comparație cu unele antibiotice.

6.3 Material și metodă

Din produsul vegetal uscat *Prunus spinosa* L. *fructus* recoltat din județul Tulcea, au fost preparate două extracte apoase în diluții de 1:10 și 5:10.

Studiul în prima etapă a fost realizat pe tulpini bacteriene și fungice de referință de tip ATCC (American Type of Culture Collection) liofilizate, stabilizate și viabile (fiecare peletă folosită conține microorganismul liofilizat). Tulpinile de referință utilizate au fost: *Staphylococcus* ATCC 25923, *Streptococcus* ATCC 19615, *Enterococcus* ATCC 19433,

Escherichia coli ATCC 25922, *Pseudomonas* ATCC 27853, *Candida albicans* ATCC 10231.

Activitatea antibacteriană și antifungică pentru prima etapă a studiului II a fost determinată prin metoda difuzimetrică într-un mediu de cultură însemănat cu tulpinile de referință pe care le-am amintit mai sus [111].

Pentru realizarea etapei a II-a a studiului, ce a vizat comparația acțiunii antibacteriene produse de soluția de lucru cu unele antibiotice, tulpinile bacteriene au fost izolate după cum urmează: *Streptococcus de grup B* și *Streptococcus β hemolitic de grup A* din exudatul faringian, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus capitis* din secreția otică, *Streptococcus mutans* din caria dentară iar *Prevotella sp.* din puroiul parodontal. Identificarea speciilor bacteriene s-a realizat în sistem API. Aprecierea nivelului de sensibilitate s-a realizat comparativ cu 4 antibiotice uzuale, respectiv: Ampicilina, Amoxicilina, Azitromicina, Claritromicina, conform normelor CLSI.

6.4 Rezultate

Rezultatele obținute au demonstrat că soluțiile testate au activitate antibacteriană, dar nu au activitate antifungică, acest lucru fiind demonstrat prin rezistența totală a tulpinii de *Candida albicans* pentru ambele concentrații ale soluțiilor apoase. Activitatea antibacteriană a extractelor apoase studiate este diferențiată în funcție de concentrația substanței, astfel: față de *Staphylococcus sp.*, extractul apos de concentrație 50% a prezentat un efect antibacterian mai mare (14 mm) comparativ cu cel de concentrație 10% (11 mm).

Rezultatele obținute privind testarea efectului de sensibilitate al tulpinii de *Streptococcus sp.* la acțiunea soluțiilor, au sugerat faptul că pentru concentrația de 50% s-a măsurat un diametru al ariei de inhibiție de 14 mm, iar pentru concentrația de 10% un diametru al ariei de inhibiție de 12 mm.

Extractele apoase, în ambele concentrații, au prezentat proprietăți antimicrobiene pe specia bacteriană *Enterococcus sp.*. Pentru extractul de concentrație 50% s-a măsurat un diametru al ariei de inhibiție de 12 mm (cu apariția unor colonii mutante rezistente), iar pentru concentrația de 10% diametrul ariei de inhibiție a fost de 10 mm.

Pentru *Pseudomonas sp.* s-a observat rezistență totală pentru soluțiile apoase ale speciei în concentrații de 10% și de 50%.

Rezultatele studiului au arătat că *Escherichia coli* sp. este sensibilă, având diametrul ariei de inhibiție de 13 mm pentru concentrația mare și de 12 mm pentru concentrația mică.

Existența diferențelor privind mărimea diametrelor ariilor de inhibiție pentru toate tulpinile bacteriene testate au impus utilizarea în etapa a II-a, doar a soluției de concentrație 50%. Rezultatele obținute au arătat că extractul apos al plantei acționează diferit pe tulpinile testate, comparativ cu antibioticele utilizate, după cum urmează: efectul antibacterian față de *Staphylococcus aureus* a fost de intensitate similară cu cel al Claritromicinei (7 mm) și mai mic comparativ cu celelalte trei antibiotice. Față de *Staphylococcus capitis*, efectul antibacterian a fost de intensitate similară cu cel al Azitromicinei (8 mm) și mai mare comparativ cu al Claritromicinei.

Rezultatele studiului au demonstrat că extractul apos a prezentat o activitate antibacteriană bună pentru tulpinile de *Staphylococcus aureus* și *Staphylococcus capitis* comparativ cu a antibioticelor utilizate.

Efectul antibacterian față de *Streptococcus de grup B*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus β hemolitic de grup A* și *Prevotella intermedia* a fost mai mic în comparație cu toate antibioticele utilizate.

Discuții

Studii similare în ceea ce privește activitatea antibacteriană a speciei *Prunus spinosa* L., dar din extracte alcoolice sunt citate în literatura de specialitate, după cum urmează: extractul etanolic a fost testat asupra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* și *Candida albicans* [18] și extractul metanolic a fost testat asupra tulpinilor bacteriene de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* și *Pseudomonas aeruginosa* [19, 114].

Rezultatele prezentului studiu privind acțiunea antibacteriană a extractului apos de *Prunus spinosa* L. sunt similare cu cele mai sus citate în literatura de specialitate [37, 38, 39], luând ca și tulpină bacteriană etalon, tulpina de *Staphylococcus aureus*, care a fost prezentată în paleta de tulpini bacteriene în toate studiile mai sus citate [18, 19, 114]; acțiunea antibacteriană a extractului apos de *Prunus spinosa* L. a fost de 7 mm în cadrul prezentului studiu, iar în studiile menționate mai sus au fost mai mari, respectiv 13 ± 0.2 mm în extractul etanolic și 14.2 ± 2.2 mm în cel metanolic.

Din aceste cifre reiese că activitatea antibacteriană a extractului apos de *Prunus spinosa* L., așa cum se observă din studiul personal, este mai mică, dar consider că acțiunea antibacteriană mai mare din studiile altor autori se datorează unui cumul de efect antibacterian - alcool cu extractul din plantă, motiv pentru care apreciez că nu se poate delimita exact și fidel acțiunea antibacteriană strictă a plantei în studiile acelor autori.

În concluzie, apreciez că studiul, bazat pe o tehnică de obținere a unui extract apos din fructele uscate ale speciei *Prunus spinosa* L., poate oferi date mai exacte cu privire la efectul antibacterian asupra tulpinilor studiate.

Studii foarte recente realizate de Aliyazicioglu și colaboratorii în care s-a evaluat activitatea antibacteriană a extractelor apos și metanolic pe tulpina de *Staphylococcus aureus* comparativ cu Ampicilina și Streptomicina [115], au demonstrat rezistența totală atât la antibiotice cât și la cele două tipuri de extracte din plantă; aceste rezultate diferite comparativ cu cele obținute în studiul personal se datorează probabil condițiilor pedoclimatice diferite ale zonelor din care s-a realizat recoltarea.

În literatura de specialitate studiată există foarte puține date cu privire la sensibilitatea tulpinilor bacteriene frecvent implicate în apariția cariei dentare (*Streptococcus mutans*) și a bolii parodontale (*Prevotella intermedia*) la acțiunea extractelor din specia *Prunus spinosa* L.

Legat de speciile bacteriene implicate în producerea cariei dentare, rezultate similare cu cele obținute în prezentul studiu sunt citate în literatura de specialitate de către Smullen și colaboratorii care au identificat existența acțiunii antibacteriene a extractului apos din specia *Prunus spinosa* L. asupra tulpinii *Streptococcus mutans* [116].

În literatura de specialitate studiată nu am găsit date legate de proprietățile antibacteriene ale extractelor din specia *Prunus spinosa* L. asupra speciei bacteriene *Prevotella intermedia* implicată în producerea bolii parodontale; singurele date citate sunt legate de acțiunea antibacteriană a unor extracte etanolicе, cloroformice, etanol-apoase dar și apoase din alte plante ce conțin compuși fenolici [117,118].

6.6 Concluzii preliminare

1. Activitatea antibacteriană a extractelor apoase utilizate poate fi consecința conținutului de taninuri, dar și a unor posibile interacțiuni între componentele fenolice identificate în cadrul studiilor anterioare.

2. Cele două soluții apoase realizate în cadrul primei etape au prezentat efecte antibacteriene față de tulpinile de referință testate (10-14 mm).

3. Diametrul ariei de inhibiție crește odată cu creșterea concentrației de soluție apoasă, cel mai bun rezultat obținându-se la concentrație 50% pe *Staphylococcus* ATCC 25923 și *Streptococcus* ATCC 19615 (14 mm).

4. Tulpinile de *Pseudomonas* ATCC 27853 și *Candida albicans* ATCC 10231 au fost total rezistente față de ambele concentrații ale soluției apoase testate.

5. Cea mai bună activitate antibacteriană comparativ cu antibioticele testate, s-a înregistrat pe *Staphylococcus capitis*, acțiunea antibacteriană fiind egală cu cea a Azitromicinei (8 mm) și mai mare decât a Claritromicinei (6 mm).

6. Pe tulpina de *Staphylococcus aureus* s-a înregistrat o activitate antibacteriană identică cu cea a Claritromicinei (7 mm) și foarte apropiată de Azitromicină (8 mm), respectiv Ampicilină (9 mm).

7. Pentru tulpina de *Streptococcus mutans* s-a obținut un nivel al ariei de inhibiție mai mic față de cel al antibioticelor testate.

8. Rezultatele obținute demonstrează că extractul apos are activitate antibacteriană moderată și asupra speciilor de *Streptococcus de grup B* și *Streptococcus β hemolitic de grup A*, această activitate fiind mai mică comparativ cu cea a antibioticelor testate.

9. Pentru tulpina de *Prevotella intermedia* s-a obținut cel mai scăzut nivel al ariei de inhibiție (4 mm) comparativ cu cel al antibioticelor testate.

10. Rezultatele studiului demonstrează că cele două extracte apoase obținute din specia *Prunus spinosa* L. pot fi utilizate în viitor pentru dezvoltarea unor produse farmaceutice noi, cu proprietăți antibacteriene, creându-se astfel premisele limitării fenomenului de rezistență și multirezistență la antibiotice, problemă stringentă și de mare actualitate în practica medicinei moderne.

CAPITOLUL. 7 STUDIUL III - EFECTUL ANTIOXIDANT AL SOLUȚIEI APOASE DE *PRUNUS SPINOSA* L. EVALUAT PRIN BIOMARKERII COTININĂ SALIVARĂ ȘI IL-6

7.1 Introducere

Extractul apos obținut din fructele speciei *Prunus spinosa* L. s-a dovedit a avea activități antioxidante în cadrul studiului I, motiv pentru care cercetarea a fost direcționată în sensul evidențierii acestor proprietăți în cavitatea orală.

7.2 Ipoteza de lucru

1. Evaluarea nivelului de stres oxidativ și existența unei posibile corelații între biomarkerul cotinină salivară și statusul clinic orodentar la subiecți fumători activi, ocazionali și nefumători.

2. Evaluarea nivelului de stres oxidativ și existența unei posibile corelații între cotinină salivară, IL-6 salivară și statusul dentoparodontal la subiecții cu boală parodontală cronică superficială și profundă.

I. Evaluarea nivelului stresului oxidativ evaluat prin biomarkerul cotinină salivară în cadrul unui lot de subiecți clinic sănătoși orodentar

I.7.3 Material și metodă

Au fost concepute chestionare standard pentru a colecta informații cu privire la consumul de tutun în cadrul lotului de studiu. Am colectat probe de salivă de la fiecare subiect în conformitate cu prospectul conținut de kitul *NicAlert*TM [119].

În prima fază s-a realizat clătirea cavității orale timp de 7 zile cu soluția martor (apă fiartă și răcită); la final s-a recoltat din nou salivă și s-au evaluat nivelurile cotininei salivare.

A doua fază a presupus clătirea cavității orale pe o perioadă de 7 zile cu soluția apoasă; la final s-a repetat recoltarea salivei și s-au evaluat nivelul cotininei salivare.

I.7.4 Rezultate

În urma auto-evaluării pe baza chestionarelor completate, s-a realizat distribuția categoriilor de fumători/nefumători în lotul de studiu. Apoi s-a realizat încadrarea voluntarilor în lotul de studiu conform kitului de interpretate.

S-au putut observa diferențe între cele două tipuri de *status*-uri: cel declarat - prin completarea chestionarelor și cel dovedit - prin nivelul cotininei salivare cuantificate, astfel: există un procent mai mic al fumătorilor activi demonstrat după dozarea cotininei salivare, comparativ cu procentul celor încadrați pe baza chestionarelor. De asemenea, s-a înregistrat un procent mai mare de fumători ocazionali comparativ cu procentul rezultat pe

baza chestionarelor, iar pentru nefumători un procent mai mic comparativ cu cei încadrați pe baza chestionarelor.

După utilizarea soluției martor s-au observat limitat variații în sensul creșterii - 2 probe și scăderii - 2 probe ale nivelului cotininei salivare înainte și după clătiri, aspect ce este explicat prin variațiile de consum de produse ce conțin tutun, dar și de expunere la fumul de țigară în rândul voluntarilor înainte și după testare.

După utilizarea soluției apoase, nivelurile cotininei salivare au scăzut sau au rămas constante, cu o singură excepție, explicația fenomenului fiind legată de variațiile de consum de produse ce conțin tutun, dar și de expunerea la fumul de țigară în rândul voluntarilor înainte și după testare.

Nu s-au obținut diferențe semnificativ statistice ($p > 0.05$; t-test) între valorile cotininei salivare înainte și după utilizarea soluției martor. Existența diferențelor înalt semnificativ statistice, $p = 0.001$ între valorile cotininei salivare înainte și după clătiri cu soluția apoasă de *Prunus spinosa* L., demonstrează eficacitatea soluției în reducerea concentrației cotininei salivare și implicit scăderea nivelului de stres oxidativ în cavitatea orală.

I.7.5 Discuții

În literatura de specialitate studiată nu au fost găsite informații cu privire la cercetări ale efectelor extractelor obținute din plante asupra nivelului cotininei salivare. Singurele date identificate sunt referitoare la diferite preparate ce conțin principii active din alte plante (de exemplu plante din subclasa *Magnoliidae*), cu rol de scădere a nivelului nicotinei în organism [121]. De asemenea, Narotzki și colaboratorii au demonstrat că prezența polifenolilor din ceaiul verde reduce stresul oxidativ și inflamația din cavitatea orală instalate ca urmare a fumatului și implicit a prezenței nicotinei [122].

Prin urmare, se poate aprecia că studiul personal ce reflectă scăderile nivelurilor cotininei salivare, metabolit primar al nicotinei, după clătiri cu soluția apoasă, se aliniază la alte studii realizate în aceeași direcție.

Măsurarea nivelurilor cotininei în fluidele biologice a fost folosită și în alte studii științifice pentru evaluarea nivelului de stres oxidativ după expunerea la consumul de tutun [123]. Astfel, mai multe tehnici analitice au fost utilizate pentru măsurarea nivelurilor de cotinină în fluidele organismului la fumători și la nefumători, inclusiv cea cantitativă [123]

și, de asemenea măsurători semicantitative (testele NicAlert) [124], utilizate și în cadrul acestui studiu.

Rezultatele mele sunt similare cu cele obținute de Nucă și colaboratorii care au dozat cotinina salivară cu scopul evaluării obiective a fumatului pasiv la adulții nefumători; apreciez că rezultatele obținute se alătură rezultatelor altor studii și permit astfel obținerea unor informații noi cu privire la evaluarea nivelului de stres oxidativ prin cuantificarea acestui metabolit al nicotinei [125,126,127].

Rezultatele mele sunt în concordanță cu alte studii realizate pentru evaluarea expunerii la tutun și a dependenței de nicotină, ceea ce arată că măsurarea cotininei salivare, chiar și printr-o metodă semicantitativă ca NicAlert™ Saliva, este o metodă foarte valoroasă pentru evaluarea consumului de tutun [128,129,130].

În studiul de față s-au folosit chestionarele ca modalitate standard de clasificare a subiecților în fumători (constanți și ocazionali) și nefumători. Studii transversale axate pe consumul de tutun ce folosesc în general evaluarea fumatului și a dependenței de nicotină cu ajutorul chestionarelor, au fost abordate și în alte studii [131,132,133].

I.7.6 Concluzii

1. Rezultatele demonstrează că soluția apoasă de *Prunus spinosa* L., are efect antioxidant demonstrat prin scăderea cotininei salivare.

2. Rezultatele obținute sugerează că nivelul cotininei salivare poate oferi informații utile privind nivelul stresului oxidativ în cavitatea orodentară.

3. Efectul benefic al soluției apoase de *Prunus spinosa* L. privind scăderea nivelului de stres oxidativ în cavitatea orodentară la subiecții fumători sănătoși clinic orodentar este demonstrat prin diferențele valorice privind biomarkerul cuantificat înainte și după clătiri cu soluția de testat ($p=0.001$).

4. Rezultatele acestui studiu demonstrează necesitatea extinderii cercetărilor privind acțiunea antioxidantă a soluției apoase din specia *Prunus spinosa* L. în cavitatea orodentară.

Studiul II. Evaluarea nivelului stresului oxidativ prin biomarkerii cotinină salivară și IL-6 salivară în cadrul unui lot de subiecți cu boală parodontală cronică, superficială și profundă

II.7.3 Material și metodă

După aplicarea criteriilor de excludere, lotul a fost format din 24 subiecți nefumători (cu vârste cuprinse între 35-44 ani din județul Constanța), selectat dintr-un total de 37 de subiecți. În urma examenului clinic s-au înregistrat următorii parametri: adâncimea pungii parodontale pe baza indicelui CPI (Community Periodontal Index) și indicele de sângerare gingivală GI (Gingival Index).

Rata de răspuns a fost de 100% pentru AMBELE ETAPE ALE STUDIULUI și a cuprins:

- 5 subiecți sănătoși (CPITN=0; GI=0, respectiv nu s-a înregistrat sângerare gingivală la nici unul dintre dinții examinați);
- 11 subiecți cu parodontită marginală superficială (CPI=2; între 4 și 9 dinți cu sângerare gingivală);
- 8 subiecți cu parodontită marginală cronică profundă (CPI=3/4; între 7 și 12 dinți cu sângerare gingivală).

Generarea și colectarea materialului biologic (saliva) s-a realizat prin aceeași metodă prezentată anterior (Studiul I). Kitul de cotinină a fost prezentat în cadrul studiului precedent (Studiul I), iar kitul pentru IL-6 salivară utilizat este produs de firma Salimetrics, USA și permite determinarea cantitativă a acestui biomarker prin tehnica ELISA (enzime linked immunosorbent assay).

Soluția utilizată a fost soluția apoasă 10% *Prunus spinosa* L. obținută prin aceeași metodă ca în cadrul studiilor anterioare. Au fost efectuate clătiri ale cavității orale timp de 1 minut, de două ori pe zi, timp de 10 zile, utilizând 10 ml soluție apoasă. După cele 10 zile, s-au evaluat clinic orodentar cei 24 subiecți și s-a realizat din nou colectarea salivei.

Citirea și interpretarea nivelurilor de cotinină salivară și IL-6 s-a realizat înainte și după studiul intervențional la care subiecții au participat, pe baza acordului scris și informat liber exprimat.

II. 7.4 Rezultate

Au fost evaluați parametri clinici înregistrați și nivelurile cotininei salivare și ale interleukinei 6 înainte și după utilizarea soluției apoase de *Prunus spinosa* L. pe o perioadă de 10 zile.

În cadrul lotului martor, rezultatele obținute au demonstrat că nu există semnificație statistică între valorile cotininei salivare înainte și după clătiri ($p=0.373$); observăm însă

existența unor diferențe semnificativ statistice între valorile IL-6 salivară înainte și după clătiri ($p=0.049$).

De asemenea, în cadrul lotului de pacienți cu boală parodontală cronică superficială nu au existat diferențe semnificativ statistice între valorile adâncimilor pungilor parodontale înainte și după clătiri ($p=0.264$); există însă diferențe înalt semnificativ statistice între valorile indexului gingival înainte și după clătiri ($p<0.0001$).

Între valorile cotininei salivare măsurate înainte și după clătiri în cadrul acestui lot, nu au existat diferențe semnificativ statistice ($p=0.077$).

Rezultatele obținute în cadrul lotului de adulți cu boală parodontală cronică superficială au arătat existența unei diferențe cu semnificație statistică între șirurile de valori ale IL-6 înainte și după clătiri ($p=0.050$).

În cadrul lotului de pacienți cu boală parodontală cronică profundă au existat diferențe semnificativ statistice între valorile adâncimilor pungilor parodontale înainte și după clătiri ($p=0.049$); de asemenea, rezultatele obținute au arătat existența unor diferențe înalt semnificativ statistice între valorile GI înainte și după utilizarea soluției apoase de *Prunus spinosa* L. ($p=0.002$) și a unor diferențe statistice între valorile IL-6 înainte și după clătiri cu soluția de studiu ($p=0.041$).

În cadrul acestui lot, nu au existat diferențe semnificativ statistice între valorile cotininei salivare înainte și după clătiri cu soluția de studiu ($p=0.350$).

Rezultatele au demonstrat că există diferențe semnificativ statistice între valorile IL-6 înainte și după clătiri cu soluția de studiu ($p=0.041$) în cadrul lotului de adulți cu boală parodontală cronică profundă.

Pentru a stabili posibilele corelații între parametri clinici și biomarkerii salivari cotinină și IL-6, am constituit un unic lot de studiu cu boală parodontală cronică superficială și profundă.

Rezultatele obținute au demonstrat că există o corelație foarte slabă ($r=0.035$) între cotinina salivară (ng/ml) și GI înainte de utilizarea soluției de studiu la pacienți cu boală parodontală.

A existat însă corelație slabă ($r=0.164$) între cotinina salivară (ng/ml) și GI înainte de utilizarea soluției de studiu la pacienți cu boală parodontală, între cotinina salivară și

adâncimea pungii parodontale înainte de utilizarea soluției de studiu ($r=0.218$) și între cotinină și punga parodontală după clătiri ($r=0.319$)

Se corelează rezonabil valoarea IL-6 cu a indexului gingival înainte de clătiri ($r=0.505$), existând de asemenea și diferențe semnificativ statistice ($p=0.027$); de asemenea, se corelează IL-6 cu indexul gingival după clătiri ($r=0.454$), existând și diferențe semnificativ statistice ($p=0.050$).

Există corelație rezonabilă și între IL-6 și adâncimea pungii parodontale înainte de clătiri ($r=0.557$), cu diferențe semnificativ statistice ($p=0.013$).

De asemenea, există corelație, dar slabă între IL-6 și adâncimea pungii parodontale după clătiri ($r=0.377$), fără a exista însă diferențe semnificativ statistice ($p=0.111$).

7.5 Discuții

În literatura de specialitate studiată, nu am găsit cercetări în care să se evalueze ținut rolul antioxidant al speciei *Prunus spinosa* L. asupra bolii parodontale. Interesul pentru utilizarea extractelor din plante în cadrul bolii parodontale este mare și este demonstrat prin faptul că sunt citate în literatura de specialitate, dar pentru alte plante.

Într-un studiu publicat în 2012, autorii au prezentat efectele produse de apa de gură obținută prin asocierea unor plante ca *Centella asiatica*, *Echinacea purpurea* și *Sambucus nigra* în cadrul bolii parodontale. În urma studiului, a fost observată o scădere a valorii indexului gingival după finalizarea tratamentului în cadrul lotului de pacienți care a utilizat apa de gură naturală, comparativ cu lotul martor care a utilizat ca și soluție martor, apa [141].

Într-un alt studiu, autorii prezintă faptul că unele componente volatile ale unor plante (timol, eugenol, eucaliptol) produc scăderi ale nivelurilor indexului gingival după perioada de tratament comparativ cu produsul placebo [142]. În aceeași direcție a fost realizat și studiul lui Karim și al colaboratorilor care au prezentat o reducere semnificativă a indexului gingival după utilizarea plantei *Aloe vera* [143].

În cadrul altui studiu, ce a presupus aplicări locale ale uleiului de măsline ozonat, s-a obținut o semnificație statistic înaltă ($p<0.001$) în ceea ce privește scăderea adâncimii pungii parodontale după 8 săptămâni de tratament, comparativ cu preparatul placebo [144].

Există în literatura de specialitate studii similare cu cele ale prezentului studiu, dar pe alte plante, cu compoziție similară cu cea găsită în cadrul studiului realizat.

Astfel, au fost studiate plante în care există compuși fenolici, cum sunt studiile efectuate de Nănescu și colaboratorii, care au evaluat rolul compușilor polifenolici din extractul de ceai verde în boala parodontală și au obținut modificări ale unor parametri parodontali (scăderea indicelui de sângerare gingivală cu rezultate semnificativ îmbunătățite și reducerea adâncimii pungilor parodontale)[145]. Rezultatele acestui studiu sunt în concordanță cu rezultatele prezentului studiu, demonstrând beneficiile pe care le au compușii fenolici în diminuarea stresului oxidativ în boala parodontală.

Efectul benefic al polifenolilor în cadrul bolii parodontale a fost demonstrat și prin reducerea citokinei IL-6 salivară în studii realizate de Zdařilová și colaboratorii din fructele speciei *Lonicera caerulea* L, rezultatele obținute fiind similare cu cele din studiul prezent [146].

De asemenea, în cadrul studiului realizat de Jeong și colaboratorii este evidențiat rolul compusului lindenyl acetat izolat din specia *Lindera strychnifolia* în reducerea IL-6 implicată în boala parodontală [147].

Rezultatele obținute în cadrul studiului meu arată că în ceea ce privește cei doi markeri evaluați, cotinina și IL-6 salivari în cadrul loturilor de pacienți cu boală parodontală cronică superficială și profundă pot servi ca instrumente de apreciere a efectului potențial terapeutic al soluției obținute din specia *Prunus spinosa* L. în cadrul bolii parodontale. Această afirmație este susținută de faptul că există diferențe înalt semnificativ statistice privind valorile indexului gingival înainte și după clătiri cu soluția de studiu, atât la pacienții cu parodontită superficială ($p < 0.0001$), cât și la pacienții cu parodontită cronică profundă ($p < 0.002$).

În ceea ce privește adâncimea pungii parodontale, există diferențe semnificativ statistice după utilizarea soluției de testat, numai la pacienți cu boală parodontală cronică profundă ($p = 0.049$), dar mai slabe comparativ cu diferențele obținute în cazul indexului gingival; acest aspect a fost explicat de clinicieni prin faptul că indexul gingival este un parametru de evaluare clinică care se ameliorează înaintea adâncimii pungii parodontale.

Privind cei doi biomarkeri luați în studiu, este de subliniat faptul că prin comparație, IL-6 și cotinină salivară, biomarkerul IL-6 este mai sensibil privind evaluarea posibilei eficiențe terapeutice a soluției de studiu; afirmația este susținută de faptul că există diferențe semnificativ statistice privind valorile IL-6 salivară, înainte și după clătiri cu

soluția de studiu, atât la pacienți cu parodontită cronică superficială ($p=0.050$), cât și la cei cu parodontită cronică profundă ($p=0.041$).

De asemenea, IL-6 salivară se dovedește a fi un important biomarker în diagnosticul și aprecierea evoluției bolii parodontale sub tratament și prin faptul că IL-6 salivară se corelează atât înainte de utilizarea soluției de testat cu indexul gingival ($r=0.505$) și cu adâncimea pungii parodontale ($r=0.557$), cât și după utilizarea soluției de testat, astfel: cu indexul gingival ($r=0.454$) și cu adâncimea pungii parodontale ($r=0.377$). Există de asemenea o corelație slabă între cotinină și indexul gingival respectiv adâncimea pungii parodontale atât înainte cât și după utilizarea soluției de testat.

7.6 Concluzii preliminare

1. Rezultatele obținute demonstrează efectul antioxidant al soluției apose studiate, prin existența diferențelor semnificativ statistice privind valorile biomarkerului IL-6 salivar evaluat înainte și după clătiri în cadrul celor 3 loturi de subiecți testați ($p<0.05$).

2. Diferențele valorice cu înaltă semnificație statistică ale indexului gingival - ca și parametru clinic de evaluare dentoparodontală cuantificate înainte ($p<0.0001$) și după ($p=0.002$) clătiri cu soluția de studiu demonstrează rolul benefic al soluției în ameliorarea statusului clinic orodentar la pacienți cu diferite forme clinice de parodontită.

3. Există diferențe privind adâncimea pungii parodontale înainte și după clătiri cu soluția apoasă de *Prunus spinosa* L. ($p=0.049$), dar mai slabe, demonstrând că ameliorarea pungii parodontale necesită o perioadă mai îndelungată și tratament asociat.

4. Biomarkerul cotinină salivară are un nivel scăzut de sensibilitate privind posibilitatea de evaluare a statusului clinic înainte și după clătiri cu soluția de studiu la toate loturile studiate ($p>0.05$).

5. Rezultatele prezentului studiu nostru creează premiza generării în viitor a unui preparat farmaceutic cu proprietăți antioxidante vizând protejarea și ameliorarea statusului dentoparodontal.

CAPITOLUL 8. ORIGINALITATEA ȘI CONTRIBUȚIILE INOVATOARE ALE TEZEI

Întrucât până în prezent în literatura de specialitate studiată nu sunt prezentate caracteristicile microscopice ale fructelor speciei *Prunus spinosa* L., lucrarea aduce ca

element de originalitate cuantumul de informații noi privind profilul microscopic al fructelor uscate ale acestei specii.

Un alt element de originalitate este reprezentat de rezultatele obținute privind compoziția chimică, acțiunea antibacteriană și antioxidantă a fructelor și a soluțiilor apoase ale speciei *Prunus spinosa* L. recoltate din județul Tulcea, care pot fi adăugate la studiile fitochimice și fitofarmacologice cunoscute ale speciei din alte regiuni ale lumii.

Nota de originalitate a tezei este imprimată de studierea capacității antioxidante a soluției apoase de *Prunus spinosa* L. utilizând ca instrumente de apreciere biomarkerii cotinină salivară și IL-6 salivară la subiecții sănătoși și la pacienți cu boală parodontală superficială și profundă.

Teza reprezintă prima cercetare a capacității antioxidante a speciei *Prunus spinosa* L. determinată printr-o serie de analize a constituenților ce aparțin clasei de compuși fenolici.

De asemenea, teza reprezintă prima cercetare la nivel național cu privire la studiul antioxidant in vivo al fructelor speciei *Prunus spinosa* L. recoltate din județul Tulcea, astfel fiind furnizate o serie de date ce pun în evidență efectul protector al principiilor active conținute de această specie asupra stresului oxidativ din cavitatea orodentară.

Ținând cont că fumatul este un factor de risc important în apariția și progresia bolii parodontale, primul element de noutate demonstrat prin rezultatele obținute este acela că soluția apoasă de *Prunus spinosa* L. scade nivelul stresului oxidativ la subiecții sănătoși orodentar fumători și nefumători, demonstrând efectul protectiv al soluției în cavitatea orodentară și al existenței posibilității de a preîntâmpina într-o oarecare măsură apariția bolii parodontale.

Al doilea element de noutate absolută al tezei este posibilitatea utilizării extractului apos din specia *Prunus spinosa* L. în ameliorarea diferitelor forme de boală parodontală.

Al treilea element de noutate absolută al tezei îl reprezintă evaluarea nivelului stresului oxidativ după utilizarea extractului apos din *Prunus spinosa* L. prin cuantificarea biomarkerilor cotinină salivară și IL-6 salivară.

Rezultatele au fost obținute prin studii interdisciplinare aflate la limita de demarcație dintre medicină dentară, farmacognozie, farmacologie, microbiologie,

utilizându-se tehnici și echipamente moderne care au conferit exactitate absolută rezultatelor obținute.

CAPITOLUL 9. CONCLUZII GENERALE

1. Cercetările farmacognostice efectuate asupra fructelor uscate ale speciei *Prunus spinosa* L. au pus în evidență prezența polifenolilor totali, respectiv a taninurilor, compuși cu proprietăți antibacteriene și antioxidante.
2. Studiile microbiologice realizate cu ajutorul soluțiilor apoase obținute din pulpa fructelor uscate ale speciei au demonstrat existența efectelor antibacteriene față de toate tulpinile de referință testate, cu excepția tulpinilor de *Pseudomonas* și *Candida albicans* care au fost total rezistente.
3. Activitatea antibacteriană a soluției de testat asupra tulpinilor bacteriene izolate din produse patologice umane a arătat că soluția are activitate antibacteriană comparabilă cu unele antibiotice.
4. Rolul benefic al soluției în ameliorarea bolii parodontale este dovedit prin existența diferențelor valorice ale indexului gingival - atât la pacienții cu parodontită cronică superficială ($p < 0.0001$), cât și la cei cu parodontită cronică profundă ($p = 0.002$).
5. Efectul benefic al soluției este demonstrat și prin diferențele privind adâncimea pungii parodontale înainte și după clătiri cu soluția apoasă de *Prunus spinosa* L. la pacienții cu parodontită cronică profundă ($p = 0.049$).
6. Soluția apoasă de *Prunus spinosa* L. utilizată are efect antioxidant demonstrat prin scăderea după clătiri cu soluția de testat a cotininei salivare la subiecții fumători sănătoși clinic orodentar ($p = 0.001$) și a IL-6 în cadrul pacienților cu boală parodontală ($p < 0.05$).
7. Rezultatele obținute arată că biomarkerul cotinină salivară are un nivel scăzut de sensibilitate comparativ cu biomarkerul IL-6 salivar privind posibilitatea de evaluare a statusului clinic înainte și după clătiri cu soluția de studiu, atât la subiecții sănătoși cât și la cei cu diferite forme clinice de parodontită ($p > 0.05$).
8. Rezultatele obținute susțin includerea biomarkerului IL-6 salivar în grupul biomarkerilor prin care se pot monitoriza diferite forme clinice de boală

parodontală în contextul utilizării și a altor soluții aplicate cu scopul ameliorării statusului clinic dentoparodontal.

9. Rezultatele acestui studiu demonstrează necesitatea extinderii cercetărilor privind acțiunea antioxidantă a soluției apoase din specia *Prunus spinosa* L. în cavitatea orodentară.
10. Rezultatele cercetării multidisciplinare realizate în cadrul tezei se aliniează altor studii similare aducându-și aportul la dezvoltarea cunoașterii, constituind în același timp un punct de plecare pentru obținerea unor produse ce pot întreține sau pot ameliora starea de sănătate orodentară.

REFERINȚE SELECTIVE

1. Pârvu C., Enciclopedia plantelor – Plante din Flora României, vol. IV, Editura Tehnică, București, 2005, pag. 135-138;
12. Obeidat M., Shatnawi M., Al-alawi M., Al-Zu`bi E., Al-Dmoor H., Al-Qudah M., El-Qudah J., Otri I., Antimicrobial Activity of Crude Extracts of Some Plant Leaves, Research Journal of Microbiology, 2012, 7:59-67;
14. Veličković M.J., Kostić A.D, Stojanović S.G., Mitić S.S., Mitić N.M., Randelović S.S., Đorđević S.A., Phenolic composition, antioxidant and antimicrobial activity of the extracts from *Prunus spinosa* L. fruit, Scientific Paper Hem. Ind., 2014, 68(3): 297–303;
15. Radovanović C.B., Milenković Anđelković S.A., Radovanović B.A., Anđelković Z.M., Antioxidant and antimicrobial activity of polyphenol extracts from wild berry fruits grown in Southeast Serbia, Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 2013, 12(5): 813-819;
16. Sikora E., Bieniek I.M., Borczak B., Composition and antioxidant properties of fresh and frozen stored blackthorn fruits (*Prunus spinosa* L.), Acta Sci. Pol., Technol. Aliment., 2013, 12(4): 365-372;
19. Radovanović, B. C., Anđelković, S. M., Radovanović, A. B., & Anđelković, M. Z. (2013). Antioxidant and antimicrobial activity of polyphenol extracts from wild berry fruits grown in southeast Serbia. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 12(5), 813-819
21. Istudor V., Farmacognozie, Fitochimie, Fitoterapie, vol.I, Editura Medicală, București, 1998, pag.188;
24. Mingjiang L., Song S., Huanrong L., Xiaoyu J., Peng N., Changrong W., Xiaoxi L., Fenghua L., Jianqin X., The protective effect of caffeic acid against inflammation injury of primary bovine mammary epithelial cells induced by lipopolysaccharide, Journal of Dairy Science, 2014, Volume 97, Issue 5: 2856–2865;
25. Hengxi M., Jianmei C., Qin F., Jinghua P., Yiyang H., Roles of Chlorogenic Acid on Regulating Glucose and Lipids Metabolism, Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2013, 11 pages;
30. Sivananthan M., Antibacterial activity of 50 medicinal plants used in folk medicine, International Journal of Biosciences, 2013, Vol. 3, No. 4, 104-121;

32. Jin H.J., Han-Ok L., Yong-Joon C., Jeongmi K., Jongsik C., Jaehyuk C., Younghoon L., Won Hee J., A Vanillin Derivative Causes Mitochondrial Dysfunction and Triggers Oxidative Stress in *Cryptococcus neoformans*, PLoS One. 2014; 9(2): e89122;
33. Charalampos Proestos 1,*, Konstantina Lytoudi 1, Olga Konstantina Mavromelanidou 1, Panagiotis Zoumpoulakis 2 and Vassileia J. Sinanoglou 3, Antioxidant Capacity of Selected Plant Extracts and Their Essential Oils, Antioxidants 2013, 2, 11-22; doi:10.3390/antiox2010011;
37. Laxminarayan R., Duse A., Wattal C., Zaidi K.M.A., Wertheim F.L.H, Sumpradit N., Vlieghe E., Hara G.L., et al., The Lancet Infectious Diseases, Antibiotic resistance—the need for global solutions, 2013, Volume 13, Issue 12:1057 – 1098;
38. Basnyat B., Antibiotic resistance needs global solutions, The Lancet Infectious Diseases, 2014, Volume 14, Issue 7:549 – 550;
39. Summary of the latest data on antibiotic resistance in the European Union - Report, European Centre for Disease Prevention and Control, Stockholm, 2013, <http://ecdc.europa.eu/en/eaad/Documents/antibiotics-resistance-EU-data-2013.pdf>;
- 61.Dhotre P.S., Suryakar A.N., Bhogade B.R., Oxidative Stress in Periodontitis, European Journal of General Medicine, 2012; 9(2):81-84;
66. Kalam S., Gul M.Z., Singh R., Ankati S., Free Radicals: Implications in Etiology of Chronic Diseases and Their Amelioration through Nutraceuticals, Pharmacologia, 2015, Volume 6 Issue 1:11-20;
72. 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 Român de Medicina de Laborator, 2010, Vol. 18, Nr. 3/4 :61-70;
73. Nuca C., Amariei C., Badea V., Zaharia A., Bucur L., Arendt C., Salivary Cotinine - Biomarker Of Tobacco Consumption In The Assessment Of Passive Smoking Prevalence, Farmacia, 2012, Vol.60, 5:662-674;
77. Al-Tarawneh S., Border M., Dibble C., Bencharit S., Defining Salivary Biomarkers Using Mass Spectrometry-Based Proteomics: A Systematic Review, OMICS A Journal of Integrative Biology, 2011, Volume 15, Number 6:353-361;

79. Marrone G., Paulpillai M., Evans R., Singleton E, Heishman S., Breath Carbon Monoxide and Semiquantitative Saliva Cotinine as Biomarkers for Smoking, *Hum Psychopharmacol.*, 2010, 25(1): 80–83;
82. Samaranayake L.P., *Essential Microbiology for Dentistry*, Second Edition, Elsevier Limited 2002, pp 224-238;
86. Mills M., Immunological and Inflammatory Aspects of Periodontal Disease, <http://media.dentalcare.com/media/en-US/education/ce1/ce1.pdf>.
90. Van Holten T.C., Waanders L.F., de Groot P.G., Vissers J., Hoefer I.E., Pasterkamp G., Prins M.W., Roest M., Circulating biomarkers for predicting cardiovascular disease risk; A systematic review and comprehensive overview of meta-analyses, *MPLoS One*. 2013, 8(4):e62080;
94. Olinescu A., Panait M., *Introducere in Imunologie*, Editura Info Medica, 2004: 213-230;
100. Akdis M., Burgler S., Cramer R., Eiwegger T., Fujita H., Gomez E., Klunker S., Meyer N., et al., Interleukins, from 1 to 37, and interferon- γ : Receptors, functions, and roles in diseases, *The Journal of allergy and clinical immunology*, 2011, volume 127, number 3:701-721;
103. In Ki N., Min J., Soo Hwan K., Seo Ra L., Ki Ho P., Dong Hwan K., Hanna Hyun K., Young Guk P., Assessment of IL-6, IL-8 and TNF- α levels in the gingival tissue of patients with periodontitis, *Experimental and therapeutic medicine*, 2013, 6: 847-851;
106. *Farmacopeea Română Ediția a X a*, Editura Medicală, București, 1993, pg.67-68, 335, 419-421, 921-922, 951-952, 1006-1016, 1018-1019, 1051-1065, 1124-1162.
108. *Farmacopeea Europeană –Third Edition 1997*, Council of Europe, France 2000, pg.36, 41-42, 55, 119, 121, 457-458, 837- 838, 936-938, 1647, 1664.
109. Ruiz-Rodríguez, M., Ancos, B. D., Sánchez-Moreno, C., Fernández Ruíz, V., Sánchez Mata, M. C., & Tardío, J. (2014). Wild blackthorn (*Prunus spinosa* L.) and hawthorn (*Crataegus monogyna* Jacq.) fruits as valuable sources of antioxidants| Les fruits du prunellier sauvage (*Prunus spinosa* L.) et delâaubâpine (*Crataegus monogyna* Jacq.) sont de prâcieuses sourcesdâantioxydants.
111. Popa M.I., *Diagnosticul de laborator în Microbiologie*, Editura Medica bucurești, 2004, pg. 95-100.

114. Irem Cankaya., Arabaci Anul S., Ekizoglu M., Erdogdu C., Cicek Polat D. and Coskun M., Antioxidant, antimicrobial activities and total phenolic content of *Prunus spinosa* L. L. subsp. *Dasyphylla* (Schur) Domin and its secondary metabolites, 2nd International Conference and Exhibition on Pharmacognosy, Phytochemistry & Natural Products, August 25-27, 2014, Volume 2, Issue 5, pg.94.
115. PHENOLIC COMPONENTS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF *Prunus spinosa* FROM GUMUSHANE, TURKEY Rezzan Aliyazicioglu^{1*}, Oktay Yildiz², Huseyin Sahin³, Ozan Emre Eyuboglu³, Mehtap Tugce Ozkan¹, Sengul Alpay Karaoglu⁴, Sevgi Kolayli³ CHEMISTRY OF NATURAL COMPOUNDS · MARCH 2015, pg 1+2
116. Caries Research 2007;41:342–349 DOI: 10.1159/000104791 The Antibacterial Activity of Plant Extracts Containing Polyphenols against *Streptococcus mutans* J. Smullen G.A. Koutsou H.A. Foster A. Zumbé D.M. Storey
117. Hindawi Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine Volume 2011, Article ID 680354, 15 pages doi:10.1093/ecam/nep067 Review Article Traditional Medicinal Plant Extracts and Natural Products with Activity against Oral Bacteria: Potential Application in the Prevention and Treatment of Oral Diseases
118. European Journal of Pharmacology Volume 720, Issues 1–3, 15 November 2013, Pages 77–83, Use of polyphenols in periodontal inflammation, Iro Palaskaa, Evangelos Papathanasioua, b, Theoharis C. Theoharidesa, c, d
119. http://craigmedical.com/Nicotine_Saliva_tests.htm
121. WU, Jie. *Method for Decreasing Nicotine and Other Substance Use in Humans*. U.S. Patent Application 11/972,993, 2008;
122. Narotzki, B., Reznick, A. Z., Aizenbud, D., & Levy, Y. (2012). Green tea: a promising natural product in oral health. *Archives of oral biology*, 57(5), 429-435.
123. Benowitz NL. Cotinine as a biomarker of environmental tobacco smoke exposure. *Epidemiol Rev* 1996; 8: 188-204.
124. Studts JL, Sameer RG, Gill JL, Studts CR, Barnes CN, LaJoie AS et al. Validity of Self-reported Smoking Status among Participants in a Lung Cancer Screening Trial. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; 15(10): 1825-8.

125. Binnie V., McHugh S., Macpherson L., Borland B., Moir K., Malik K., The validation of selfreported smoking status by analysing cotinine levels in stimulated and unstimulated saliva, serum and urine. *Oral Dis* 2004; 10: 287-93.
126. Jarvis M.J., Tunstall-Pedoe H.,Feyerabend C. Comparison of tests used to distinguish smokers from nonsmokers. *Am J Public Health* 1987; 77: 1435-8.
127. Nuca C., Amariei C., Badea V., Zaharia A., Bucur L., Arendt C., Salivary cotinine - Biomarker of tobacco consumption in the assessment of passive smoching prevalence, *Farmacia*, 2012, Vol. 60, 5, pg.662-674.
128. Glover ED, Glover PN, Laflin MT, Nochur SV, Strnad JV. Sensitivity and specificity of a reagent-impregnated test strip in identifying smokeless tobacco users. *Nicotine Tob Res* 2007; 9: 499-503.
129. Nishida N, Yamamoto Y, Tanaka M, Maeda K, Kataoka K, Nakayama K et al. Association between passive smoking and salivary markers related to periodontitis. *J Clin Perio* 2006; 33(10): 717-23.
130. Parker DR, Lasater TM, Windsor R, Wilkins J, Upegui DI, Heimdal J. The accuracy of self-reported smoking status by cotinine test strips. *Nicotine Tob Res* 2002 Aug; 4(3): 305-9.
131. Benowitz NL. Cotinine as a biomarker of environmental tobacco smoke exposure. *Epidemiol Rev* 1996; 8: 188-204.
133. Glasgow RE, Mullooly JP, Vogt TM. Biochemical validation of smoking status: pros, cons, and data from four lowintensity intervention trials. *Addict Behav* 1993; 18: 511-27.
141. Samuels, N., Grbic, J. T., Saffer, A. J., Wexler, I. D., & Williams, R. C. (2012). Effect of an herbal mouth rinse in preventing periodontal inflammation in an experimental gingivitis model: a pilot study. *Compendium of continuing education in dentistry* (Jamesburg, NJ: 1995), 33(3), 2046.
142. Kraivaphan, P., & Amornchat, C. (2012). Effect of an essential oil-containing dentifrice on established plaque and gingivitis.
143. Karim, B., Bhaskar, D. J., Agali, C., Gupta, D., & Gupta, R. K. (2011). Effect of Aloe vera mouthwash on periodontal health: Triple blind randomized control trial. *J Clin Periodontol*.

144. Patel, P. V., Patel, A., Kumar, S., & Holmes, J. C. (2012). Effect of subgingival application of topical ozonated olive oil in the treatment of chronic periodontitis: a randomized, controlled, double blind, clinical and microbiological study. *Minerva stomatologica*, 61(9), 381-398.
145. Nănescu, S., Mârțu, S., Ciomaga, G., Toma, V., Forna, D., & Foia, L. (2011). Dual effects of flavonoids on dyslipidemia and Periodontal disease. *Romanian Journal of Oral Rehabilitation*, 3(4), 38;
146. Zdařilová, A., Svobodová, A. R., Chytilová, K., Šimánek, V., & Ulrichová, J. (2010). Polyphenolic fraction of *Lonicera caerulea* L. fruits reduces oxidative stress and inflammatory markers induced by lipopolysaccharide in gingival fibroblasts. *Food and Chemical Toxicology*, 48(6), 1555-1561.
147. Jeong, G. S., Lee, D. S., Li, B., Kim, J. J., Kim, E. C., & Kim, Y. C. (2011). Anti-inflammatory effects of lindenyl acetate via heme oxygenase-1 and AMPK in human periodontal ligament cells. *European journal of pharmacology*, 670(1), 295-303.

LISTA CU LUCRĂRILE PUBLICATE DIN DOMENIUL TEZEI DE DOCTOR

ARTICOLE PUBLICATE ÎN REVISTE COTATE ISI IN EXTENSO

„Contributions to the Antimicrobial and Antifungal study of the aqueous extract of *Prunus spinosa* L.”, **GABRIELA GEGIU**, Andrei-Dan Branza, Laura Bucur, Mircea Grigorian, Traian Tache, Victoria Badea, Revista Farmacia, Vol.63, 2, 2015, revista indexata ISI, avand factor de impact 1.251 in 2013, pg.275-279;

ARTICOLE ISI PROCEEDINGS IN EXTENSO

“Study regarding the effect of *Prunus spinosa* species on *Streptococcus mutans*”, **G. GEGIU**, C. Nuca, L. Bucur, M. Grigorian, V. Badea, 2nd International Multidisciplinary Scientific Conference on Social Sciences and Arts SGEM 2015, SGEM2015 Conference Proceedings, ISBN 978-619-7105-44-5, ISSN 2367-5659, Book 1, Vol. 1, Aug 26 - Sept 01 2015, 937 - 942 pp;

„Study regarding the effect of *Prunus spinosa* aqueous solution on salivary cotinine-marker of oxidative stress”, **GEGIU, G.**, Badea, V., Nuca, C., Badea, C., Branza, A., Grigorian, M., & Tache, T., SGEM 2014 Conference on Psychology and Psychiatry, Sociology and Healthcare, Education, Conference Proceedings, Vol. 2, ISBN 978-619-7105-23-0, ISSN 2367-5659, September 1-9, 2014, pp 877-884;

POSTER CU REZUMAT PUBLICAT ÎN REVISTE COTATE ISI

„Studies regarding the antibacterial action of water extracts of *Prunus spinosa* L.”, **GEGIU GABRIELA**, Nuca Cristina, Bucur Laura, Grigorian Mircea, Branza Andrei-Dan, Badea Victoria, 2nd Congress of the Romanian Association of Medical Laboratories with international participation, 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, S93-S94.

