

---

TEZA DE DOCTORAT

# Evaluarea potențialului terapeutic al hidrogelurilor îmbogățite cu uleiuri esențiale în boala parodontală indusă la șobolan

---

Doctorand Ștefana Maria Cristina Mureșan

---

Conducător de doctorat Prof. Univ. Dr. Liviu Ioan Oana

---



# REZUMAT

## Introducere

Cercetările în stomatologia umană vizează și crearea de noi agenți antimicrobieni de utilizare în diverse terapii în ceea ce privește igienizarea și antiseptizarea dinților sau ameliorarea plăcii bacteriene orale. La ora actuală aceeași direcție este implementată și în medicina dentară veterinară, aceasta fiind adaptată după ideologiile și metodele terapeutice create pentru pacienții umani, cu respectarea anumitor diferențe de specie.

Substanțele fito-chimice naturale reprezintă o alternativă eficientă privind tratamentul cu antibiotice care se consideră a fi tot mai nocive, promovând un efect nedorit de antibioretistență, astfel potența uleiurilor esențiale sunt din ce în ce mai cercetate pe piața medicală atât umană, cât și veterinară.

Scopul sintezei de astfel de materiale implică atât utilizarea substanțelor naturale, cât și introducerea acestora în diverse compozite adaptate nevoilor unei terapii țintite prin ajustarea proprietăților fizico-chimice întrunind nevoile de eliberare treptată, de control al absorbției la nivelul cavității bucale, targetarea unei anumite zone afectate, fără a avea efecte sistemice negative, fără a determina toxicitate locală sau generalizată, totodată fiind mult mai accesibile unui public larg, reușind să îmbunătățească nivelul social și speranța de viață a populației animale și umane.

Aceste testări își propun să investigheze efectele hidrogelurilor îmbogățite cu extract natural de ulei esențial de Oregano® și Thieves®. Determinările fizico-chimice și biochimice care s-au propus se realizează în scopul caracterizării biomaterialelor, dar cuprind și testele de citotoxicitate *in vitro* și efectul antimicrobian al acestor compuși.

## Structura tezei

Teza de doctorat intitulată "Evaluarea potențialului terapeutic al hidrogelurilor îmbogățite cu uleiuri esențiale în boala parodontală indusă la șobolan" conține 133 de pagini și este structurată în două părți.

Prima parte reprezintă stadiul actual al cunoașterii, este împărțită în 3 capitole și se extinde pe un număr de 33 de pagini. Aceasta cuprinde notiuni generale despre boala parodontală, patogeniza complexă a acestei patologii, dar și informații despre stadializare, simptomatologie, diagnostic, date care interesează protocoalele terapeutice generale cu actualități legate de abordări noi în ceea ce privește terapia și importanța tratării acesteia prin mijloace care să asigure potență antimicrobiană. Nu în ultimul rând sunt prezentate date ce țin de proprietățile benefice ale uleiurilor esențiale și utilizările acestora în domeniul medical. De asemenea, sunt prezentate informații care

privesc abordarea medicală a bolii parodontale și protocoale de inducere experimentală a acestora în vederea testării mai multor parametri și biomateriale.

A doua parte conține 97 de pagini și reprezintă contribuția personală. Aceasta este structurată în 8 capitole, 4 din ele fiind reprezentate de studiile desfășurate în perioada 2018-2022. Capitolul 4 ilustrează ipoteza de lucru și obiectivele cercetării, în timp ce capitolele 5, 6, 7 și 8 se referă la 4 studii distincte, *in vitro* și *in vivo* fiecare conținând obiective, materiale, metode, rezultate și discuții, precum și concluziile cercetărilor realizate. Capitolul 9 prezintă concluziile generale și recomandările, iar capitolul 10 prezintă originalitatea și contribuțiile inovative ale acestei tezei.

## Obiectivele cercetării

Obiectivul principal al tezei vizează crearea și testarea unor produse, de tip hidrogel, alcătuit din polimeri cu adaosuri de diferite uleiuri esențiale, cu proprietăți deja cunoscute, acestea fiind reprezentate de efecte antimicrobiene, antiinflamatoare, imunomodulatoare și antioxidante în boala parodontală și totodată necesitatea formulării unor recomandări de terapie alternativă aplicabile în boala parodontală la șobolan, care să amelioreze, să trateze și să stopeze procesul parodontal.

Din multitudinea de biomateriale compozite testate în patologiile orale, acestea intră în categoria medicinei alternative și regenerative dentare, datorită posibilelor efecte așteptate în urma terapiei antibacteriene, terapiei regenerative locale al ligamentului parodontal și al osului alveolar, cât și ameliorarea semnelor clinice de mobilitate și sângerare dentară, atât în patologia acută (paradontită), cât și într-un proces cronic (paradontoză).

De asemenea, ne-am propus ca în acest studiu, să evaluăm biocompatibilitatea hidrogelurilor îmbogățite cu uleiuri esențiale din câteva plante recunoscute cu efecte benefice în terapia afecțiunilor orale. Dorim ca rezultatele obținute în cadrul acestui studiu să ducă la posibilitatea propunerii unei terapii eficiente în afecțiunile parodontale la animale.

Obiectivele secundare vizează studiile fizico-chimice, microbiologice, biocompatibilitatea și toxicitatea celulară, respectiv evaluarea *in vivo* a unor hidrogeluri, care la rândul ei vizează biocompatibilitatea și efectele hidrogelurilor în paradontita indusă experimental la șobolani. Studiul cercetează și capacitatea potențial-regenerativă al biomaterialului în ceea ce privește țesutul moale, respectiv gingia cu ligamentele parodontale, cât și țesutul dur osos alveolar. Astfel obiectivele secundare se conturează după cum urmează:

- Testarea *in vitro* a hidrogelului îmbogățit cu ulei esențial de Oregano®, de Frankincense® și mixul Thieves®, prin testul MTT, care determină citotoxicitatea și biocompatibilitatea celulară, precum și evaluarea potențialului antimicrobian și bacteriostatic prin determinarea indicelui MIC și MBC (efect inhibitor minim și efect

bactericid minim) pe patru culturi bacteriene de referință, precum: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis* și *Escherichia coli*.

- Inducerea *in vivo* a unui protocol experimental de parodontită și urmărirea semnelor clinice specifice bolii paradontale la șobolani Wistar.
- Evaluarea clinică terapeutică a materialelor utilizate, prin determinarea scorului de sângerare, indicelui de laxitate și fluctuației greutății corporale.
- Evaluarea *in vivo* a efectelor locale antiinflamatorii și antioxidante a biomaterialelor și a terapiei fotodinamice utilizată sau terapie mixtă, prin determinarea biomarkerilor salivari specifici MMP8 și 8-OH-d-Guanozina, cât și a biomarkerilor sistemici pentru inflamație IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ .
- Evaluarea post-mortem a leziunilor induse și a potențialului terapeutic a terapiei fotodinamice și a terapiei cu hidrogeluri versus combinația dintre acestea, prin examinarea imagistică cu ajutorul tomografiei micro-computerizate și prin examenul histopatologic.

## Rezultatele cercetării

Capitolul 5 intitulat „Evaluarea fizico-chimică a unor hidrogeluri îmbogățite cu uleiuri esențiale de Oregano<sup>®</sup>, Frankincense<sup>®</sup> și mixul Thieves<sup>®</sup>” reprezintă un studiu în care este prezentată metoda de sintetizare a hidrogelurilor îmbogățite cu niște molecule biologice active precum și caracterizarea fizico-chimică a acestora. Acestea sunt reprezentate de uleiurile esențiale extrase din Oregano<sup>®</sup> și dintr-un amestec de mai multe uleiuri esențiale denumit Thieves<sup>®</sup>. Determinările fizico-chimice, precum analiza GC-MS în care s-au identificat compușii activi ai uleiurilor esențiale din hidrogelurile luate în studiu (eugenol, pinen, limonen, carvacrol și cimen) reprezintă prima caracterizare, iar cea de-a2-a include analiza UV-Vis care a permis identificarea compușilor bioactivi din uleiurile esențiale luate în cercetare înglobate în matricea polimerică redată de hidrogel. Includerea uleiurilor esențiale în hidrogeluri nu a afectat compușii activi ai acestora (Eugenolul, Carvacrolul, Timolul și alte terpene), oferind o bună stabilitate moleculară.

În capitolul 6 intitulat „Analiza microbiologică și citotoxică a hidrogelurilor îmbogățite cu uleiuri esențiale” s-a efectuat testarea citotoxicității și a biocompatibilității celulare pentru hidrogelurile sintetizate prin testul MTT, utilizând o linie celulară specifică derivată din papila dentară umană, iar determinarea analizei microbiologice pe o serie de tulpini de referință precum *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis* și *Escherichia coli* prin evaluarea efectului inhibitor minim și bactericid a reprezentat cea de-a2-a determinare *in vitro* efectuată.

În capitolul 7 denumit „Evaluarea efectelor hidrogelurilor pe bază de ulei esențial de Oregano<sup>®</sup> și Thieves<sup>®</sup> în boala paradontală indusă la șobolan”, conform rezultatelor obținute *in vitro*, în special a efectului antimicrobian, s-au ales doar 2

hidrogeluri bazate pe ulei esențial de Oregano® și Thieves® în vederea testării *in vivo*. Astfel s-a reușit inducerea parodontitei prin protocolul experimental aplicat, prin plasarea unei ligaturi la baza molarului abordat, în vederea acumulării a unei plăci bacteriene consistente și creării unui buzunar parodontal care să genereze un răspuns inflamator acut. S-a evaluat inducerea bolii parodontale la șobolani prin monitorizarea greutății corporale, respectiv a apetitului post-ligaturare și prin examenul clinic specific parodontal reprezentat de scorul de sângerare și indexul de laxitate/mobilitate dentară, iar paraclinic s-au evaluat o serie de biomarkeri specifici pentru inflamație locală și sistemică, cât și niște biomarkeri salivari implicat în distrucția tisulară consecutivă acumulării de placă bacteriană, hemoragie, procese supurative și necroză locală.

În capitolul 8 numit „Evaluarea imagistică și histopatologică a efectelor terapeutice în parodontita indusă la șobolan” s-a urmărit a se evalua din punct de vedere imagistic, cu ajutorul micro-computerului tomograf, evoluția leziunilor la nivel osos și periosos ale zonelor cu parodontită indusă experimental la șobolani și totodată s-a realizat evaluarea histopatologică în dinamica proceselor de vindecare a leziunilor induse experimental.

Aceste evaluări și monitorizări au indicat faptul că rezultatele terapeutice sunt eficiente, iar leziunile de parodontită acută induse pot fi ameliorate sau chiar reversate.

## Concluzii generale

Concluziile generale care se desprind din cele două studii efectuate în cadrul tezei pot fi sistematizate după cum urmează:

1. Hidrogelurile polimerice luate în studiu au înglobat uniform uleiurile esențiale de Oregano®, Frankincense® și Thieves® și s-au pretat pentru tratamentul parodontitei induse la șobolani precum și la diverse evaluări paraclinice.
2. Având în vedere compoziția și efectele antibacteriene, antiinflamatorii și regenerative ale gelurilor sintetizate, relevate prin examenele *in vivo* și *in vitro* precum și rezultatele evaluării imagistice, acestea recomandă terapia parodontitei de sine stătătoare, care ar putea fi o alternativă terapeutică la produsele utilizate în mod curent bazate în principal pe antibiotice și substanțe antiseptice.
3. Hidrogelurile luate în studiu s-au dovedit a fi biocompatibile *in vitro* și cu un bun efect antimicrobian, în special pentru cele îmbogățite cu ulei esențial de Oregano® și Thieves®
4. Ambele produse luate în studiu au arătat o biocompatibilitate sistemică eficientă evidențiată prin ameliorarea răspunsului inflamator acut, ceea ce a determinat prevenirea unor complicații a procesului parodontal.

5. Terapiile utilizate în tratamentul parodontitei au dus la diminuarea nivelului biomarkerilor salivari specifici în inflamația sistemică, cât și în inflamația locală, cu un plus pentru combinația dintre hidrogeluri cu terapia fotodinamică.
6. Prin Micro-CT s-a obținut o stadializare a procesului parodontal indus și evidențierea resorbției osoase prin cuantificarea spațiului parodontal.
7. Analiza histopatologică a confirmat eficiența hidrogelurilor luate în studiu în tratamentul parodontitei la șobolani , evidențiând o bună activitate de regenerare tisulară.
8. Rezultatele examenului histopatologic au relevat că asocierea terapiei fotodinamice cu cea a hidrogelurilor cu uleiuri esențiale au avut un efect de potențare a efectului terapeutic în paradontită indusă la șobolan.

Modificarea metodei chirurgicale de inducere a parodontitei experimentale prin plasarea unei ligaturi la baza primului molar superior stâng. Contribuția adusă se referă la trecerea firului de sutură pe sub mucoasa gingivală și pe sub palatul dur, pe o lungime de 2-3mm după ce acesta a fost înnodat deja de două ori, la baza molarului. Acest lucru fiind eficient pentru o mai bună meținere a ligaturii, pentru a evita alunecarea, asigurând o mai bună stabilitate.

Un alt element de originalitate îl constituie sinteza de biomateriale compozite bazate pe hidrogelurile polimerice și pe extractele naturale de uleiuri esențiale de Oregano® și Thieves® încapsulate în acestea, fiind destinate atât tratării patologiei parodontale, cât și a altor patologii orale, pentru efectul lor antimicrobian, antiinflamator și regenerativ.

Hidrogelurile luate în studiu au asigurat o foarte bună stabilitate a componentelor active din uleiurile esențiale de Oregano® și Thieves®, ceea ce face ca ele să poată fi utilizate în terapia parodontitei la șobolani. Acest lucru reprezintă o noutate deoarece hidrogelul folosit are o structură chimică sub formă de matrice polimerică, în care ingredientele active au fost învelite într-o peliculă subțire de policaprolactonă, un compus chimic care ușurează păstrarea constituenților bioactivi fără să îi degradeze.

Rezultatele obținute în cadrul acestui studiu deschide noi oportunități de cercetare și ne propunem pentru viitor realizarea unor forme de hidrogeluri cu consistență de tipul „caramelelor”, în care se vor îngloba uleiurile esențiale de Oregano® și Thieves®, pretabile pentru o masticăție îndelungată astfel încât componentele terapeutice să se elibereze gradual, cu eficiență în prevenirea și tratarea unor afecțiuni ale cavității orale la câine.