

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
„CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI  
ȘCOALA DOCTORALĂ  
MEDICINĂ DENTARĂ**

***STUDIUL HISTOPATOLOGIC AL ADIȚIEI  
OSOASE CU DIFERITE MATERIALE DE  
SUBSTITUȚIE ȘI MEMBRANE DE  
ACOPERIRE***

**REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT**

**Conducător de doctorat:**

**PROF. UNIV. DR. BUCUR ALEXANDRU**

**Student-doctorand:**

**NECULAE IOANA IRINA**

**2018**

## CUPRINS

Lista cu lucrările științifice publicate.....	4
Lista cu abrevieri.....	5
Introducere.....	7
1. Bazele biologice ale regenerării osoase.....	12
1.1. Țesutul osos.....	12
1.1.1. Osul cortical.....	12
1.1.2. Osul medular.....	12
1.2. Celulele osoase.....	13
1.2.1. Osteoblastele.....	13
1.2.2. Osteocitele.....	14
1.2.3. Osteoclastele.....	15
1.2.4. Celule osoase de legătură.....	16
1.3. Vascularizația osului și rolul ei în remodelarea și regenerarea osoasă.....	17
1.4. Principiile vindecării osoase și factorii de succes.....	18
2. Grefele osoase și materialele de adiție osoasă.....	23
2.1. Introducere.....	23
2.2. Tipuri de materiale de adiție osoasă.....	24
2.2.1. Autogrefe.....	26
2.2.1.1. Autogrefe intraorale.....	27
2.2.1.2. Autogrefe extraorale.....	28
2.2.2. Alogrefe.....	29
2.2.3. Xenogrefe.....	30
2.2.4. Materiale aloplastice.....	31
2.2.5. Factorii de creștere și proteinele morfogenice osoase.....	32
2.3. Membrane de acoperire folosite în regenerarea osoasă.....	35
2.3.1. Proprietățile principale ale membranelor.....	35
2.3.2. Tipuri de membrane.....	36
2.3.2.1. Membrane resorbabile.....	37
2.3.2.1.1. Membrane polimerice.....	37
2.3.2.1.2. Membrane de colagen.....	38
2.3.2.2. Membrane neresorbabile.....	38

2.3.2.2.1. Membrane de PTFE.....	38
2.3.2.2.2. Membrane de titan.....	39
2.4. PRF_ul folosit în regenerarea osoasă.....	40
3. Studiu histopatologic și histomorfometric pe animale de laborator, prin recoltarea unor fragmente biopsice, ce conțin patru tipuri de materiale de adiție osoasă.....	44
3.1. Obiective.....	44
3.2. Material și metodă.....	44
3.2.1. Procedura chirurgicală.....	44
3.2.2. Analiza histopatologică.....	48
3.3. Rezultate.....	49
3.4. Discuții.....	59
3.5. Concluzii.....	69
4. Studiu histomorfometric comparativ între trei tipuri de membrane asociate materialului de adiție în tehnicile de mărire a ofertei osoase.....	71
4.1. Obiective.....	71
4.2. Material și metodă.....	71
4.2.1. Procedura chirurgicală.....	71
4.2.2. Analiza histopatologică.....	74
4.3. Rezultate.....	75
4.4. Discuții.....	86
4.5. Concluzii.....	91
5. Studiu experimental comparativ pe animale de laborator între două materiale aloplastice de adiție osoasă asociate cu membrane de PRF.....	93
5.1. Obiective.....	93
5.2. Material și metodă.....	93
5.2.1. Procedura chirurgicală.....	93
5.2.2. Analiza histopatologică.....	97
5.2.3. Prepararea PRF_ului.....	97
5.3. Rezultate.....	98
5.4. Discuții.....	111
5.5. Concluzii.....	117
6. Concluzii generale.....	119
Bibliografie.....	121
Anexe .....	149

## PARTEA GENERALĂ

Încă din anii 1960 de când implantologia orală a devenit o procedură comună a reabilitării cavității orale, tehnicile de adădire și augmentare osoasă au stârnit un interes mare din parte chirurgilor oro-maxilo-faciali. Acest lucru s-a datorat și cerințelor pacienților din ultimii ani care doreau o reabilitare funcțională, dar și estetică în același timp și care să semene cât mai mult cu situația anatomică inițială. A realiza o terapie implanto-protetică nu este de cele mai multe ori posibil fără metode de adădire osoasă preimplantare. Defectele osoase ale creștelor alveolare pot avea diferite cauze de la pierderea timpurie a dinților până la traumatisme craniofaciale, formațiuni tumorale benigne sau maligne. Toate aceste boli determină în urma tratamentului chirurgical sechele care de cele mai multe ori au nevoie de tehnici complexe de grefare osoasă.

Anatomia defectului osos este de asemenea foarte importantă, prezența sau absența pereților înconjurători fiind critică. Când avem un defect osos cu pereți înconjurători aceștia pot să mențină grefa pe poziție, permițând o mai bună integrare a ei și deasemenea permit o mai bună vascularizare a țesutului grefat. Absența pereților osoși complică tehnicile de adădire osoasă prin faptul că materialul de adădire osoasă trebuie fixat pe patul receptor în contact intim cu acesta, iar sursele de vascularizație sunt limitate. Cele mai mici mișcări ale grefei osoase vor compromite rezultatul final.

Există trei metode prin care un defect osos poate fi reconstruit cu materiale de substituție osoasă, și anume: prin augmentare, prin adădire sau prin interpoziție (grefă de interpoziție). Augmentarea osoasă impune prezența unei cavități, a unor pereți înconjurători (de exemplu defecte maxilare postchistectomii, alveole postextractionale). Particulele de material de substituție osoasă pot fi ușor meținute pe poziție în acest tip de defect, crescând șansele de integrare, ele primind și o mai bună vascularizație, iar din periferia defectului celulele osteoformatoare vor migra printre particulele grefate. Adădita osoasă se caracterizează prin absența pereților, prin defecte osoase orizontale sau verticale, care necesită fixarea sau securizarea grefei peste defectul osos. Prin această tehnică vrem să obținem cel mai frecvent un volum osos mai mare pentru a ne ajuta în tehnicile implanto-protetice. Grefa de interpoziție se referă la secționarea osului autolog din defectul osos și crearea unui spațiu în care este intercalat materialul de substituție osoasă. Practic particulele grefate stau între două zone receptoare care îi conferă grefei vascularizație și

celule osteoformatoare. Această tehnică se folosește cel mai frecvent pentru crestele alveolare atrofiate putând fi folosită atât în plan vertical cât și orizontal.

În studiul de față am folosit doar tehnici de adiție osoasă și am comparat gradul de regenerare osoasă folosind diferite tipuri de materiale de adiție osoasă precum și trei tipuri diferite de membrane de acoperire. Membranele de acoperire sunt indispensabile în tehnicile de adiție osoasă, nepermițând țesutului moale să interfere în relația dintre țesutul gazdă și țesutul grefat.

Tehnicile de adiție osoasă sunt într-o continuă schimbare, se fac inovații pe toate planurile, dar în principal se studiază materialele de substituție osoasă atât ca design al particulelor cât și ca structură chimică, se adaugă sau nu factori de creștere, se încearcă o mărire a stabilității mecanice și totul pentru a obține o regenerare osoasă cât mai eficientă. Se știe deja că osul autolog, deși este grefa osoasă ideală, nu se găsește mereu în cantitatea necesară sau nu se poate recolta din diverse motive. Pentru astfel de situații au apărut materialele de adiție osoasă care sunt variate și care au numeroase avantaje, dar și dezavantaje. Cheia succesului în tehnicile de adiție osoasă este lipsa pe termen lung a reacțiilor imune ale organismului gazdă față de materialul grefat [6]. Sistemul imun recunoaște materialul de adiție osoasă și poate să-l rejeteze inițiind un răspuns imun împotriva lui, cu ajutorul celulelor responsabile de producerea de anticorpi. De aceea structura chimică a acestor materiale trebuie să fie biocompatibilă cu țesutul receptor, aceasta fiind una din caracteristicile de bază ale oricărui tip de grefă.

Țesutul osos este un organ care are capacitatea de a se autovindeca în cazul unei agresiuni locale prin formarea de os nou. Astfel, cele mai multe fracturi se pot vindeca spontan prin formarea unui calus intermediar [7]. După producerea unei fracturi sau intervenții chirurgicale la nivelul osului apare un răspuns inflamator cu formarea locală a unui cheag de sânge. Astfel, fibrele de colagen și țesutul osteoid mineralizat se vor combina pentru a forma un calus în jurul defectului osos. Acest calus fibros se va osifica și va forma o structură osoasă dezorganizată, un os cu aspect "de lână". Ulterior, într-o nouă fază, acest os imatur va fi înlocuit treptat de os cu structură lamelară. Celulele osteoblaste vor penetra această matrice mineralizată și totodată va începe procesul de angiogeneză cu formarea unei noi microvascularizații. Osteoblastele vor depune os nou, iar această matrice osoasă se va maturiza transformându-se în osul compact matur [6].

În ultimii 30 de ani au apărut diferite tehnici și materiale folosite pentru regenerarea osoasă a defectelor creștelor alveolare. Există o concurență acerbă între materialele de adiție osoasă aloplastice, alogenice și xenogrefe. Deși evoluția acestor

substituenți osoși a ajuns la un nivel ridicat atât ca cercetare științifică cât și ca aplicație clinică, prognosticul acestor tehnici de adiție osoasă este încă limitat în raport cu osul autolog. Această grefă autogenă are atât proprietăți mecanice prin osul cortical cât și proprietăți osteogenice prin osul medular, caracteristici ce nu au putut fi încă atinse de nicio altă grefă de substituție osoasă (alogenică, aloplastică sau heterogrefă). Materialele de adiție osoasă trebuie să fie biocompatibile, nontoxice, să aibă stabilitate mecanică, să aibă o structură poroasă tridimensională, să permită o resorbție uniformă, să ghideze formarea de os nou, să fie ușor de produs și cu un cost redus [8], [9], [10].

Regenerarea osoasă ghidată (GBR - guided bone regeneration) este o metodă chirurgicală prin care se urmărește creșterea ofertei osoase la pacienții cu creste alveolare atrofiate, în principiu realizându-se înainte de inserarea implanturilor dentare [11], [12]. Această tehnică are nevoie de două elemente: materiale de adiție osoasă și membrane de acoperire. Membranele previn invazia țesutului moale în zona grefată și permit celulelor osteogenice să repopuleze defectul osos, în timp ce particulele de grefe osoase oferă suport pentru membrane și dirijează creșterea osteoblastelor [13], [14]. Regenerarea osoasă prin GBR depinde de migrarea celulelor osteogenice pluripotente în zona defectului osos și excluderea celulelor epiteliale și a fibroblastelor care împiedică formarea de os nou. Pentru a obține regenerare osoasă trebuie ca rata de osteogeneză de la marginea defectului să depășească rata de fibrogeneză din țesutul moale înconjurător [15]. Într-o situație clinică este adesea greu să prezici eficiența adiției osoase. Pentru a asigura succesul regenerării osoase ghidate trebuie să fie îndeplinite patru principii: excluderea țesutului epitelial și conjunctiv, menținerea spațiului sub membranele de acoperire, stabilitatea cheagului de fibrină și închiderea primară a plăgii chirurgicale [16]. Materialele de adiție osoasă putem să le clasificăm în patru clase în funcție de mecanismul de acțiune: materiale osteogenice care stimulează direct celulele osteogenice să sintetizeze țesut osos, materiale osteoinductive, care induc diferențierea celulelor mezenchimale în osteoblaste, îmbunătățind formarea osoasă, materiale osteoconductive care facilitează migrarea, proliferarea și apozitia de os nou și materiale osteopromotoare care acționează ca o rețea în care celulele osoase pot crește [17], [18]. Oricum ar fi, atât biomaterialele cât și membranele de acoperire trebuie să fie biocompatibile, condiție fundamentală [19]. Hartwing în 1972 a definit că un biomaterial este compatibil cu țesutul înconjurător dacă interfața dintre țesutul vital și material este similară cu a zonelor naturale fără a induce inflamație sau răspuns imunologic [20].

Volumul osos al crestelor alveolare este adesea redus pentru a putea realiza terapii implanto-protetice și este în relație directă cu timpul scurs de la pierderea dinților, dar și de modul de apariție al edentațiilor prin: traumă, boală parodontală sau patologie endodontică [21], [22]. După extracțiile dentare o medie de 1.5 – 2 mm din osul alveolar se resorb vertical și 40% – 50% se resorb orizontal în mai puțin de șase luni [23]. Cele mai multe schimbări dimensionale ale crestei alveolare se produc în primele trei luni [24]. Dacă nu se realizează niciun tratament de restaurare protetică, pierderea osoasă a crestei alveolare va continua și astfel 40% - 60% din volumul osos al crestei alveolare este resorbit în primii trei ani [25]. Pierderea în înălțime sau verticală a crestelor alveolare este cel mai greu de manageriat, iar tehnicile de regenerare osoasă au un succes limitat pentru resorbțiile verticale. Pe de-o parte prin lipsa pereților care să susțină materialul de adiție osoasă, iar pe de altă parte printr-o dificultate de a obține o vascularizație corespunzătoare a patului receptor. Mai multe tehnici chirurgicale și biomateriale au fost dezvoltate pentru a face posibilă inserarea implanturilor în osul alveolar resorbit [26]. Deși experimentele pe animale au avut rezultate promițătoare, în realitatea clinică și în practică procedurile de adiție osoasă verticale au avut o rată de eșec ridicată [27], [28]. Principalul motiv se pare că ar fi imposibilitatea de a acoperi grefa cu țesut moale și aportul de sânge redus. Formarea țesutului de granulație și lipsa de formare a calusului osos sunt cauzate în general de instabilitatea grefei, dehiscenta plăgii chirurgicale cu expunerea grefei la mediul oral înconjurător cu posibilitatea de apariție a infecției [29]. Vascularizația insuficientă va duce la o resorbție rapidă a materialului de substituție osoasă făcând nepredictibil rezultatul adiecției osoase [28].

## CONTRIBUȚII PERSONALE

### Obiective

Teza de doctorat urmărește modul de regenerare osoasă după crearea unor defecte standardizate pe animale de experiență, defecte fără pereți înconjurători, și adăugarea lor cu diferite materiale precum osul bovin, fosfatul betatricalcic/hidroxiapatită, sticlele bioactive și osul autolog. Defectele împreună cu materialele de adăugare au fost acoperite cu diferite membrane.

Primul studiu vizează realizarea unei comparații între trei tipuri de materiale de adăugare osoasă precum și în raport cu osul autolog, analizând gradul de regenerare osoasă în funcție de prezența celulelor osteoformatoare (osteoblaste și osteocite).

Al doilea studiu urmărește modul de mărire a ofertei osoase comparând activitatea osteoformatoare de la nivelul osului din zona de interes în funcție de membranele de colagen (resorbabile) și de d-PTFE (neresorbabile). Am vrut să verificăm calitatea regenerării osoase utilizând cele mai folosite membrane barieră din tehnicile de GBR (guided bone regeneration).

În al treilea studiu am dorit să identificăm zonele de os nou format prin aspectul caracteristic al acestui tip de țesut, precum și zonele cu densitate mare de celule osteoformatoare și să facem o comparație între cele două grupuri unde am folosit materiale aloplastice de adăugare osoasă asociate cu membrane de PRF. Alt obiectiv a fost să urmărim gradul de resorbție al particulelor de material aloplastic.

### Material și metodă

Studiul a fost realizat pe iepuri din rasa New Zealand White (masculi și femele în număr egal) cu o medie de vârstă de 6 luni și o greutate de aproximativ 2,5 Kg, de la Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare pentru Microbiologie și Imunologie Cantacuzino București. Protocolul de studiu și schema experimentală au fost aprobate de Comisia de Etică a Animalelor din București.

#### *1. Procedura chirurgicală*

Animalele de experiență au fost anesteziate prin injectarea intramusculară cu 10 mg/kg de xylazină și 50 mg/kg de ketamină. Pentru studiu ne-am folosit de tibia stângă,

drept urmare zona corespunzătoare acestuia a fost rasă, iar tegumentul a fost antiseptizat cu soluție de betadină. S-a folosit un instrumentar steril specific intervențiilor chirurgicale, iar ca aparatură medicală s-a folosit fiziodispenserul Surgic Pro LED NSK și centrifuga A-PRF Choukroun.

După ce s-au anesteziat animalele de experiență s-a realizat o incizie de 5 cm lungime la nivelul tegumentului supraiacent tibiei. S-au disecat țesutul subcutanat și muscular, iar periostul a fost secționat și decolat de pe os expunându-se zona de interes. Cu ajutorul fiziodispenserului și a unei freze sferice mici, 1 mm diamerul, sub răcire abundentă cu ser fiziologic s-au realizat 5 orificii monocorticale (Fig.3.3). Peste aceste defecte s-au adăugat următoarele materialele de adiție osoasă: os bovin ( Biooss – Geistlich Biomaterials, Switzerland, granulație mică, 0,25-1mm ), fosfat betatricalcic (40% ) cu hidroxiapatită (60%) (4Bone BCH – Mis, granulație 0,5-1mm), sticlă bioactivă (Perioglass (Novabone)) și os autolog recoltat cu o freză trephine de la același specimen și din aceeași tibie.

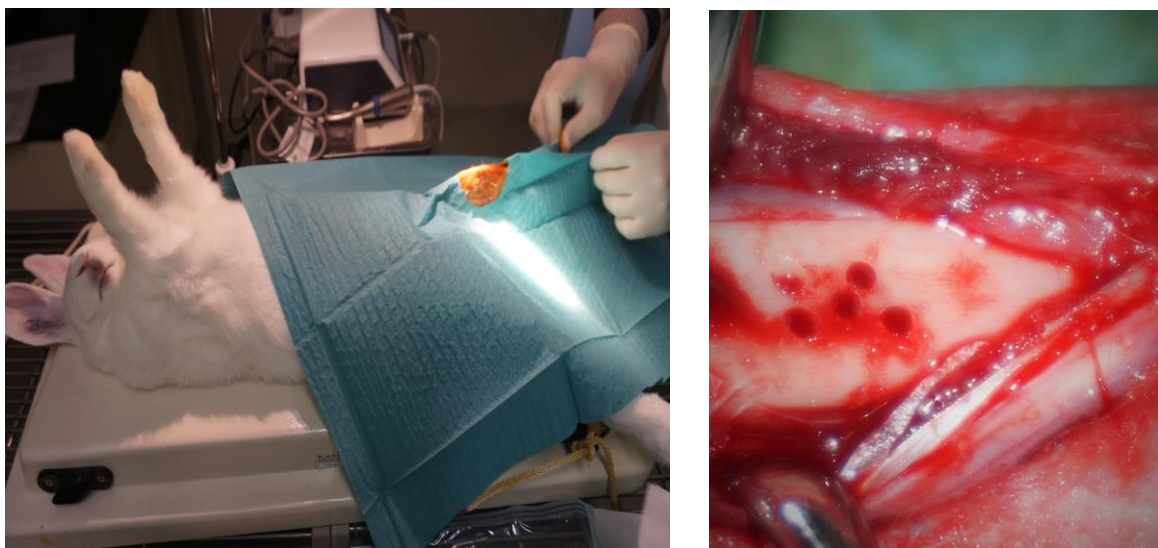


Fig. 3.3 Imagine intraoperatorie cu animalul de experiență anesteziat și cu defectul osos standardizat

Defectele osoase împreună cu materialele de adiție au fost acoperite cu următoarele membrane: membrană de collagen (Collprotect membrane – Botiss), membrana de politetrafluoretilenă nonexpandată d-PTFE (Cytoplast TxT 200), membrană de PRF, obținută prin centrifugarea sângelui animalului de experiență respectiv. După plasarea membranelor s-a realizat sutura plăgilor în trei straturi (periostul, țesutul muscular și tegumentul). Postoperator, animalelor de experiență li s-a administrat ketoprofen intramuscular timp de trei zile. Plaga postoperatorie a fost urmărită zilnic, timp de două săptămâni, făcându-se antiseptizare zilnică

cu betadină. Animalele au fost sacrificate după șase luni de la intervenția chirurgicală, prin injectare intravenoasă de fenobarbital 200 mg/ml.

## **2. Analiza histopatologică**

După șase luni s-au prelevat fragmente din tibia stângă a animalului care să conțină zona în care s-a făcut adiția. Aceste fragmente au fost fixate în soluție de formaldehidă 10%. Piesele au fost apoi decalcificate cu acid formic timp de 20 de zile, soluția fiind reînnoită periodic. După ce au fost decalcificate au fost secționare zonele de interes și a continuat procedura de rutină histopatologică. Specimenele au fost ambalate în blocuri de parafină și apoi au fost secționare cu microtomul. Secțiunile au fost fixate cu hematoxină – eozină și examinate sub microscop (Microscop optic Olympus xc 30). S-a urmărit numărul de osteoblaste și osteocite din jurul particulelor de material de adiție osoasă precum și gradul de resorbție al particulelor de material greșat, în programul Olympus CellSens Dimension.

## **3. Prepararea PRF**

S-au recoltat 10 ml sânge venos din vena centrală a urechii iepurelui înainte ca acesta să fie anesteziat, în eprubetele speciale ale sistemului de centrifugare A-PRF.

Eprubeta cu sânge a fost plasată în centrifugă, iar aceasta din urmă a fost echilibrată cu o altă eprubetă cu apă, pentru a putea obține membrana dorită. Ansamblul a fost supus centrifugării timp de 13 minute la 3000 de rotații.

După centrifugare, sângele s-a separat în trei fracțiuni; cheagul de PRF din mijloc a fost păstrat și comprimat pentru a obține o membrană. Procedura s-a repetat pentru toți cei patru iepuri din studiu de fiecare dată înainte a procedurii chirurgicale. (Fig. 5.8).

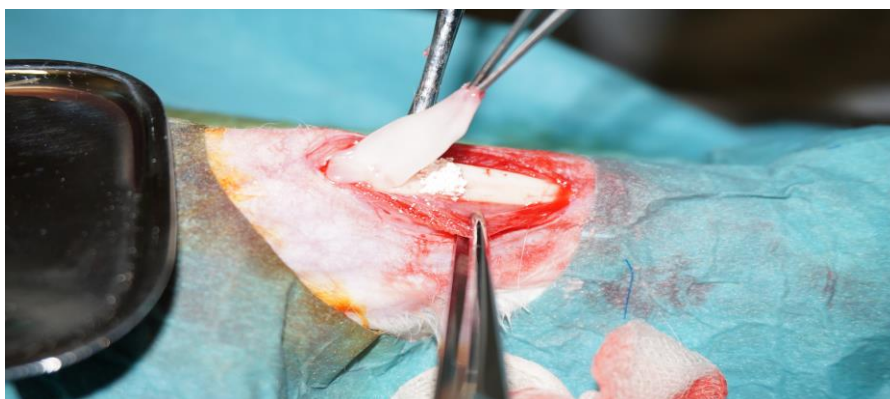


Fig. 5.7 Imagine intraoperatorie cu acoperirea defectului osos adiționat cu membrană de PRF

### 3. Studiu histopatologic și histomorfometric pe animale de laborator, prin recoltarea unor fragmente biopsice, ce conțin patru tipuri de materiale de adiție osoasă

Animalele de experiență au fost împărțite în patru grupuri în funcție de tipul de material de adiție osoasă folosit (Tabel 3.1).

Tabel 3.1 Împărțirea celor patru grupuri din studiu

Nume Grup	Nr. Animale de experiență	Material de adiție osoasă	Membrana de acoperire
<b>A</b>	6	<b>Os bovin</b>	Colagen
<b>B</b>	6	<b>Fosfat betatricalcic/ Hidroxiapatită</b>	Colagen
<b>C</b>	6	<b>Sticlă bioactivă</b>	Colagen
<b>D</b>	2	<b>Os autolog</b>	Colagen

#### 3.3 Rezultate

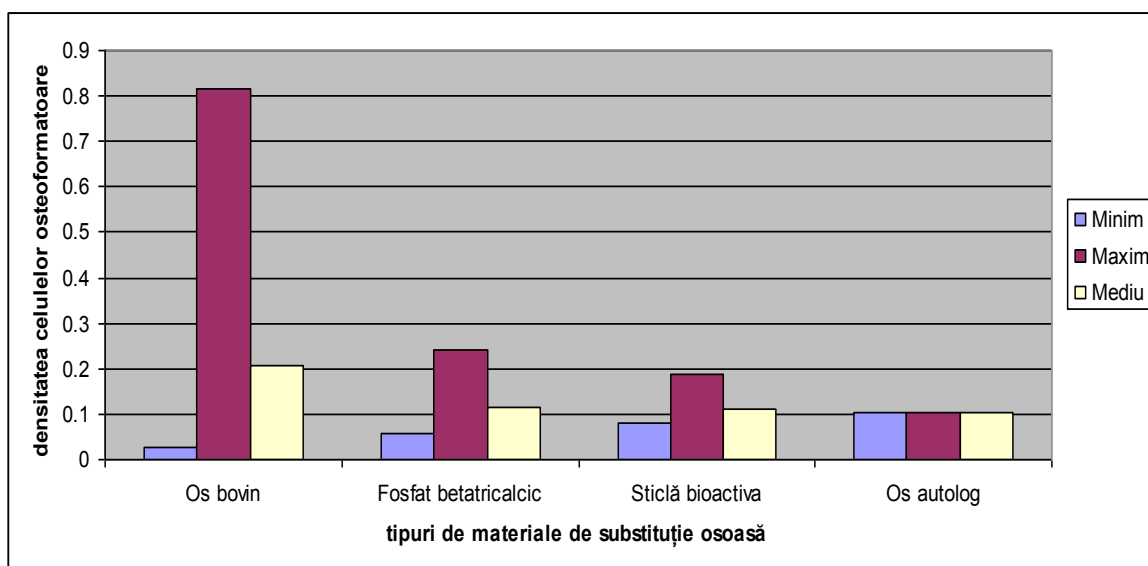
La microscopul optic s-a urmărit prezența celulelor osteoblaste și osteocite în zonele adiționate precum și gradul de resorbție al materialului de adiție osoasă. Am identificat zonele de os nou format prin numărul crescut de celule osteoformatoare, dar și prin aspectul histopatologic tipic al osului nou format care nu are structura lamelară a osului matur.

Astfel, densitatea osteoblastelor și osteocitelor este de 0,2053 pentru osul bovin, 0,1144 pentru fosfatul betatricalcic/hidroxiapatită și de 0,1096 pentru sticlele bioactive. Osul autolog are o densitate a celulelor osteoformatoare de 0,1050 (Grafic 3.1).

Numărul mediu de osteoblaste și osteocite în funcție de ariile analizate a fost de 86.64 pentru osul bovin, 61.45 pentru fosfatul betatricalcic/hidroxiapatită și de 32.00 pentru sticlele bioactive. Osul autolog a avut doar 73.50.

În urma analizei histopatologice s-a putut observa în toate cazurile analizate o resorbție parțială și aproape totală a granulelor de material aloplastic (fosfat betatricalcic/hidroxiapatită și sticle bioactive), spațiul lor nefiind înlocuit de os nou (Fig. 3.1). Astfel s-

au creat spații optic vide în interiorul corticalei osoase, spații care în timp pot submina rezistența osoasă (Fig. 3.2).



Grafic 3.1. Densitatea celulelor osteoformatoare în funcție de tipul de material de adiție osoasă

În cazul osului bovin, care are un grad redus de resorbție, particulele de material sunt prezente la nivelul zonei adiționate integrate într-o oarecare măsură în corticala osoasă, cu o activitate osteoformatoare în jurul lor. Se observă lamele de os nou format printre particulele de os bovin cu grosimi variabile, dar destul de subțiri. Prezența acestor granule neresorbite pot submina rezistența osoasă, chiar dacă pe alocuri par a fi integrate în țesutul osos cortical (Fig. 3.3). Măsurând lățimea corticalei osoase în zona de interes și într-o zonă martor cu corticala normală s-a constatat că grosimea corticalei în zona adiționată a fost mai mare, în schimb calitatea ei a fost scăzută prin prezența geodelor osoase în care nu s-a format os nou, deși particulele de material de adiție s-au resorbit.

Două din cele trei materiale, osul bovin și fosfatul betatricalcic/ hidroxiapatită se regăsesc în proporție de 80% la nivelul zonei adiționate după cele șase luni de la inserare. Deși fosfatul betatricalcic/ hidroxiapatită ar fi trebuit să se resoarbă, el este practic tot acolo integrat într-o oarecare măsură în țesutul osos cortical. Particulele de sticle bioactive sunt în schimb resorbite în proporție de 90%, dar au lăsat geode osoase goale în locul lor, spații optic vide care nu au fost înlocuite cu țesut osos nou format.

Prin resorbția prea rapidă a membranei de collagen s-a produs la unul din animalele de experiență o migrarea a granulelor de material de adiție osoasă în părțile moi. Acest lucru

a făcut ca particulele de material de adiție să determine o reacție inflamatorie cronică granulomatoasă gigantomcelulară la periferie. Chiar și în aceste condiții particulele de material de adiție osoasă tot nu s-au resorbit integral, ci doar într-o mică măsură.

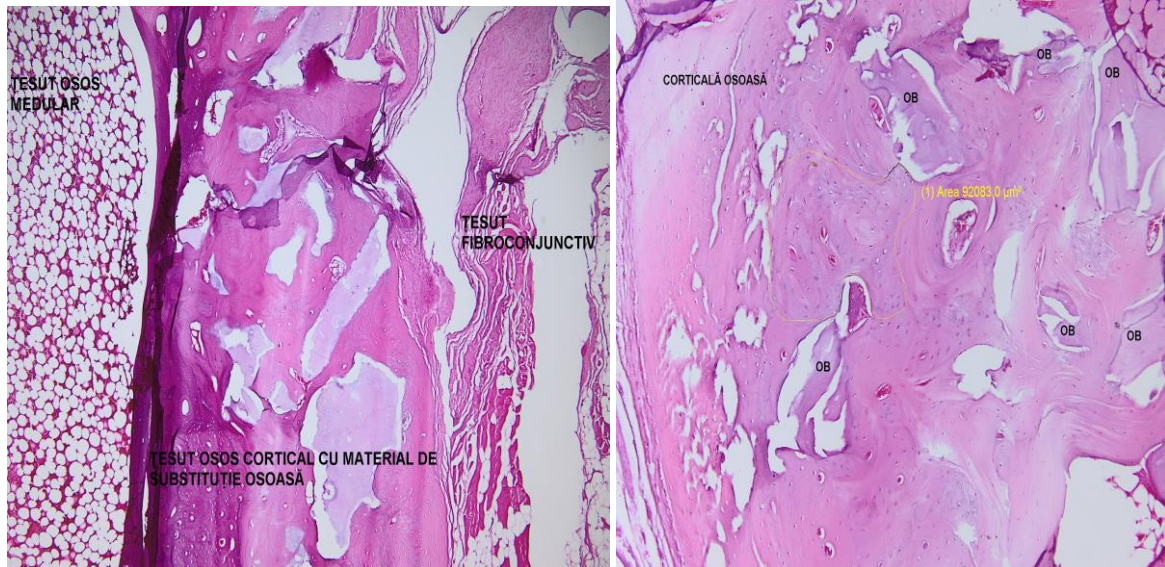


Fig. 3.1 Secțiune transversală prin tibie în zona de adiție cu fosfat betatricalcic/hidroxiapatită (prima imagine) și os bovin (a doua imagine). În grosimea corticalei se observă fragmente de material exogen hematoxilinoofil. În vecinătatea fragmentelor de material de adiție sunt mici arii cu număr crescut de osteoblaste și osteocite. Magnificație 4x (prima imagine) și 10x (a doua imagine).

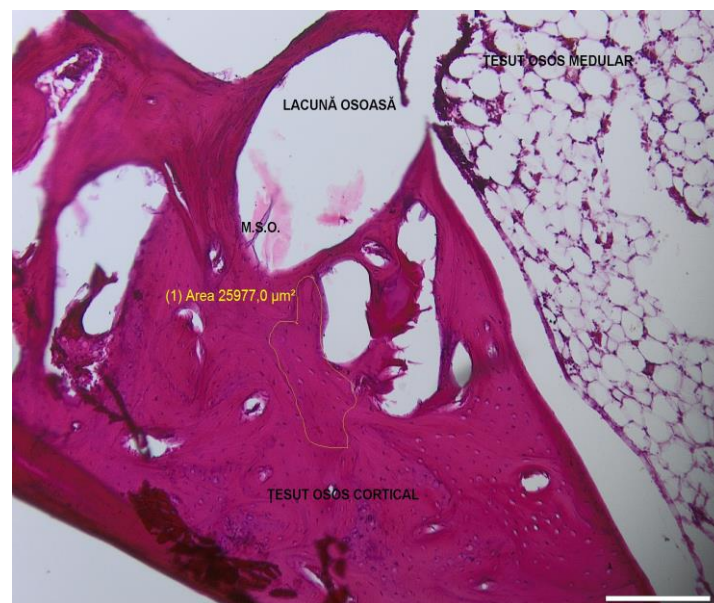


Fig. 3.3 Secțiune transversală prin tibie în zonă adiționată cu sticle bioactive (MSO) și membrană de colagen. Se observă la nivelul corticalei spații optice vide sau care conțin mici fragmente de material exogen (MSO). Magnificație 10x.

#### 4. Studiu histomorfometric comparativ între două tipuri de membrane asociate materialului de adiție în tehnicile de mărire a ofertei osoase

Cele 12 animale de experiență au fost împărțite în două grupuri în funcție de tipul de membrană de acoperire folosit (Tabel 4.1).

Tabel 4.1 Împărțirea grupurilor din studiu

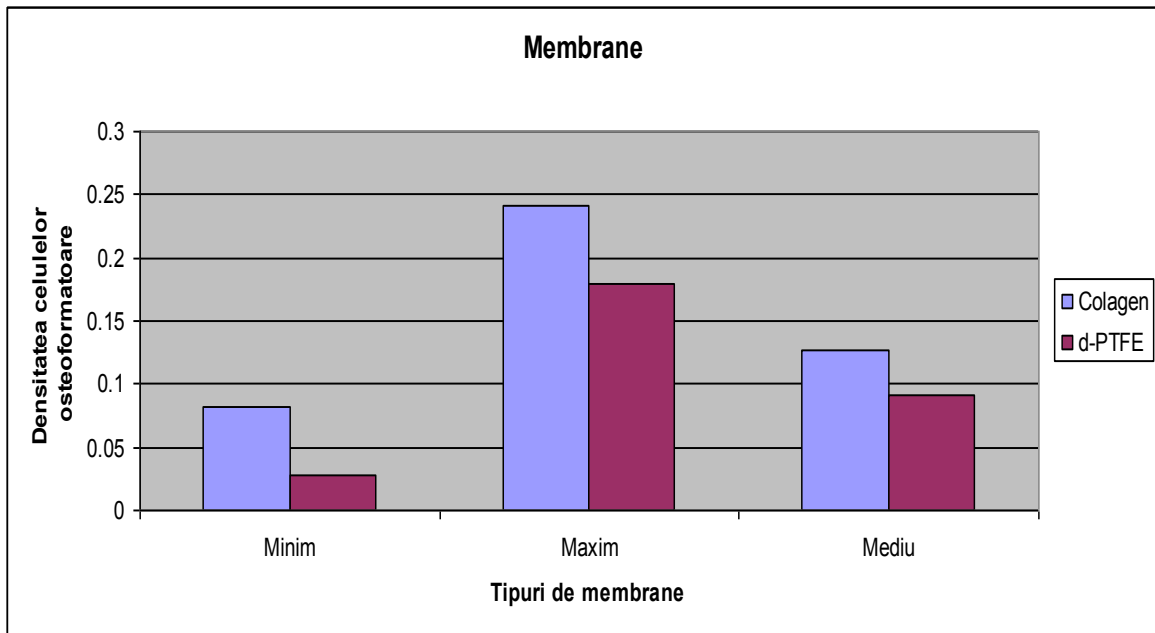
Nr. Grup	Nr. Animale de experiență	Material de adiție osoasă	Membrană de acoperire
<b>A</b>	2	Os bovin	<b>Colagen</b>
<b>A</b>	2	Fosfat betatricalcic/ Hidroxiapatită	<b>Colagen</b>
<b>A</b>	2	Sticlă bioactivă	<b>Colagen</b>
<b>B</b>	2	Os bovin	<b>d-PTFE</b>
<b>B</b>	2	Fosfat betatricalcic/ Hidroxiapatită	<b>d-PTFE</b>
<b>B</b>	2	Sticlă bioactivă	<b>d-PTFE</b>

#### 4.3 Rezultate

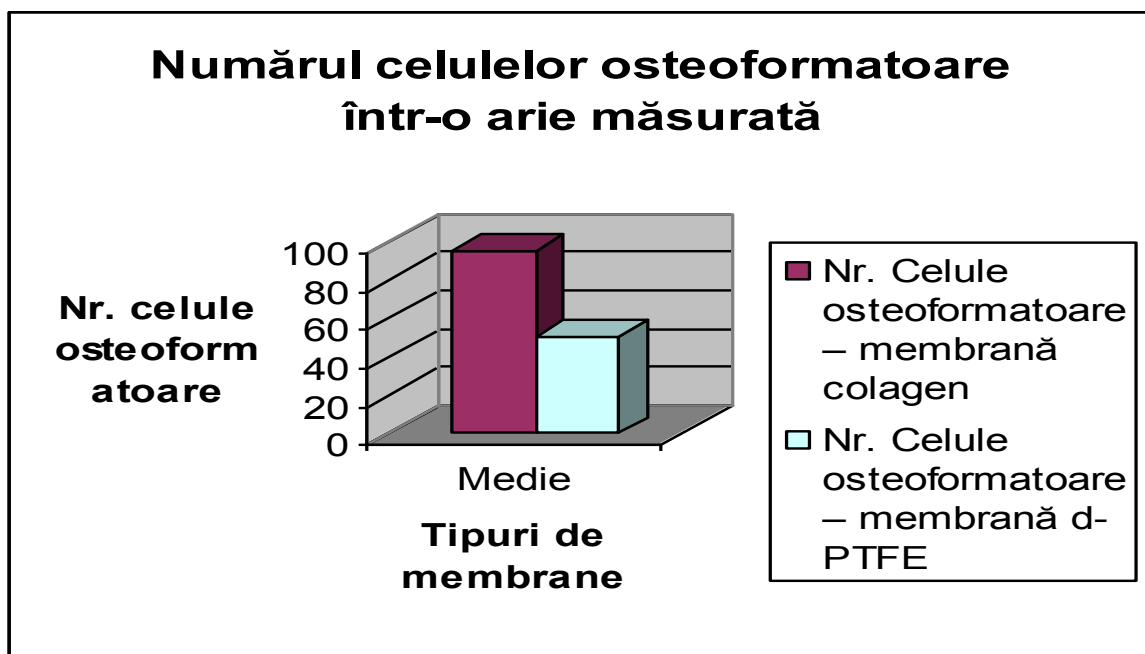
La microscopul optic am urmărit prezența celulelor osteoblaste și osteocite în zonele adiționate. Am identificat zonele de os nou format prin densitatea de celule osteoformatoare, dar și prin aspectul caracteristic histopatologic tipic al osului nou format. Astfel, densitatea osteoblastelor și osteocitelor este de 0,12 în cazul utilizării membranei de colagen și de 0,09 în cazul membranei de d-PTFE (Grafic 4.1). Numărul mediu de osteoblaste și osteocite în funcție de ariile analizate a fost de 95,54 pentru grupul A (membrana de colagen) și 50,53 pentru grupul B (membrana de d-PTFE) (grafic 4.2).

Osul nou format de sub membranele de acoperire s-a localizat doar în jurul particulelor de material de adiție osoasă și era un os imatur cu aspect trabecular. La periferia zonelor cu os imatur, de obicei s-au găsit zone cu os matur compact cu lacune pentru osteocite și aranjarea în osteoame cu multe canale haversiene care au o structură lamelară. Osul nou format nu a fost identificat în vecinătatea membranei de d-PTFE la nici unul din specișimenele din studiu, chiar a existat un spațiu între această membrană și osul cortical tibial adiționat cu materiale de substituție osoasă. Acest spațiu ar fi putut să apară

și după manevrele de secționare a blocurilor osoase din cadrul pregătirii analizei histopatologice.



Grafic 4.1 Densitatea celulelor osteoformatoare în funcție de tipul de membrană



Grafic 4.2 Numărul celulelor osteoformatoare sub cele două tipuri de membrane într-o arie măsurată

Această observație referitoare la distanța dintre osul nou format și membrana resorbabilă nu este posibilă, întrucât membrana de colagen s-a resorbit și nu a mai fost prezentă în zona adăugată după cele șase luni de studiu. Astfel, limita dintre corticala

adiționată și țesutul moale în cazul membranei de colagen nu se poate stabili, practic ea venind una în continuarea celeilalte.

În toate cazurile unde s-a folosit membrană resorbabilă a fost imposibil de a detecta dacă au mai rămas porțiuni din membrană prezente după finalizarea studiului. Celulele inflamatorii au fost absente la toate speciemenle grupului, cu excepția cazurilor când materialul de adiție osoasă a trecut în părțile moi și a declanșat o reacție inflamatorie. Formarea de os nou s-a putut observa sub toate tipurile de membrane de acoperire folosite cu o cantitate mai redusă pentru membrana de d-PTFE. Cantitatea mai scăzută poate fi influențată de doi factori în cazul membranelor resorbabile: capacitatea de a menține spațiul membranei și durata sa până se resoarbe sau colapsează. Pentru membrana neresorbabilă este important de analizat dacă ea se mișcă de pe zona receptoare sau dacă se expune mediului înconjurător. Membranele neresorbabile necesită fixarea lor pe patul receptor, în caz contrar ele se pot mobiliza foarte ușor putând să deplaseze particulele de material grefat.

Rigiditatea membranei resorbabile folosite în studiu nu a fost suficientă pentru a garanta o menținere adecvată a spațiului peste defectele standardizate chiar dacă s-au folosit materiale de adiție osoasă, care și ele au jucat un rol activ în menținerea spațiului. Cel mai frecvent capacitatea de a menține spațiul scade proporțional cu progresia resorbției membranei. O dată cu resorbția acestor membrane efectul lor de barieră scade foarte rapid înainte de a obține o regenerare osoasă. Expunerea lor va accelera procesul de resorbție și va crește infiltrarea atât bacteriană, cât și cu țesut fibros în zona grefată.

Materialele de adiție osoasă au avut grade asemănătoare de resorbție a particulelor sub cele două tipuri de membrane, nefiind influențate de acestea. Modul de resorbție a fost influențat doar de compoziția chimică a materialului grefat. Aceste particule grefate au fost integrate în corticala tibiei animalului de experiență. Prin resorbția lor au rezultat lacune osoase care nu au fost umplute cu os nou format și astfel s-a creat o corticală osoasă neomogenă cu numeroase spații optic vide la nivelul ei.

Grosimea corticalei osoase în zona adiționată a fost mai mare raportat la o altă zonă de corticală normală, cu o creștere discret mai mare pentru membrana de colagen față de membrana de PTFE (Fig. 4.1, 4.2).

Au fost zone adiționate unde prin resorbția rapidă a membranei de colagen particulele de material de adiție osoasă au trecut în părțile moi și au declanșat o reacție inflamatorie (Fig. 4.3). În aceste zone nu s-a realizat integrarea granulelor de material grefat în țesutul osos cortical, ele declanșând o reacție de corp străin.



Fig. 4.1 Secțiune transversală prin tibie în zona de adiție cu fosfat betatricalcic/hidroxiapatită (prima imagine), sticle bioactive (a doua imagine) și membrană de d-PTFE. Magnificație 1.25x.

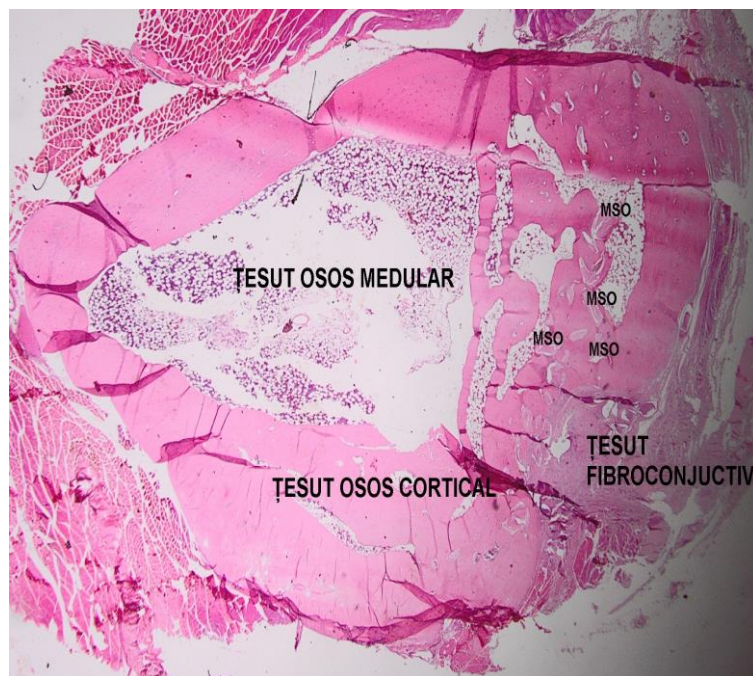


Fig. 4.3 Secțiune transversală prin tibie în zona de adiție cu os bovin (MSO) și membrană de collagen. În grosimea corticalei se observă mici fragmente de material de adiție osoasă prinse între travee de os nou formate. Aceste travee se extind și medulo-osos. Particulele de material exogen care au ajuns în părțile moi au o reacție de inflamație cronică granulomatoasă gigantocelulară în jurul lor. Magnificație 1.25x.

## 5. Studiu experimental comparativ pe animale de laborator între două materiale aloplastice de adiție osoasă asociate cu membrane de PRF

Animalele de experiență au fost împărțite în două grupuri în funcție de materialul de adiție osoasă folosit (Tabel 5.1).

Tabel 5.1 Împărțirea animalelor de experiență pe grupuri de studiu

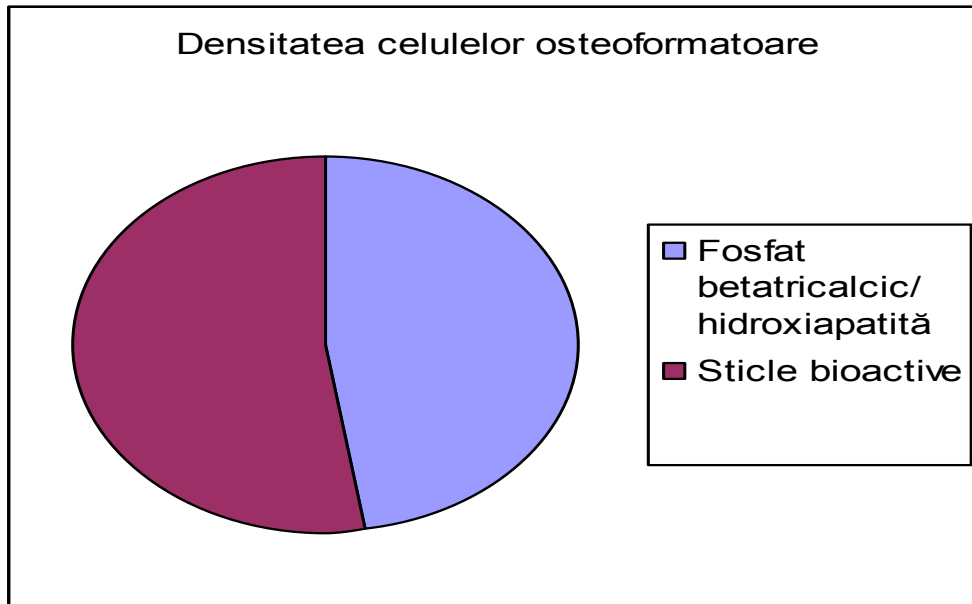
Nr. Grup	Nr. Animale de experiență	Material de adiție osoasă	Membrană de acoperire
<b>A</b>	2	Fosfat betatricalcic/ Hidroxiapatită	PRF
<b>B</b>	2	Sticle bioactive	PRF

### 5.3 Rezultate

După șase luni de la începerea experimentului au fost analizate histopatologic zonele din jurul particulelor de material de adiție osoasă unde s-a identificat o activitate osteoformatoare mai accentuată. S-au numărat celulele osteoblaste și osteocite din ariile cu densitate celulară mai mare. Astfel, densitatea celulelor osteoformatoare este de **0.0983** în cazul grefei compozite fosfat betatricalcic/hidroxiapatită (Fig. 5.10) și de **0.1104** în cazul sticlelor bioactive (Grafic 5.1).

Diferența nu este semnificativă, existând doar un mic plus pentru sticlele bioactive (Fig. 5.9). Acest lucru se poate datora resorbției aproape totale a granulelor de sticle bioactive, și încercarea organismului receptor de a produce mai mult țesut osos care să înlocuiască aceste particule. Activitatea osteoformatoare fiind o idee mai intensă pentru acest din urmă material aloplastic.

Am urmărit de asemenea gradul de resorbție al particulelor de material de adiție osoasă. Deși ambele materiale aloplastice sunt complet resorbabile după șase luni, în cazul studiului nostru doar sticlele bioactive s-au resorbit în proporție de 90%, în timp ce mixul fosfat betatricalcic/hidroxiapatită a avut un grad de resorbție de doar 20%. 80% din particulele de material aloplastic s-au regăsit la nivelul situsului receptor, aflate în stadii diferite de resorbție, dar încă prezente (Fig. 5.11)



Grafic 5.1 Densitatea celulelor osteoformatoare în funcție de materialul de adiție osoasă

Resorbția particulelor de material de adiție osoasă a început de la periferie spre centrul granulelor, lăsând un spațiu între țesutul osos cortical și limitele externe ale particulelor grefate. Activitatea osteoformatoare este mai accentuată în jurul acestor lacune osoase unde se găsesc particulele grefate, țesutul osos al gazdei încercând să umple aceste lacune cu os nou format (Fig. 5.12). Apoziția de os nou s-ar realiza tot dinspre periferia geodei osoase spre centrul acesteia, la început un os nou cu structură dezorganizată urmând apoi să se remodeleze în structura lamelară a osului matur.

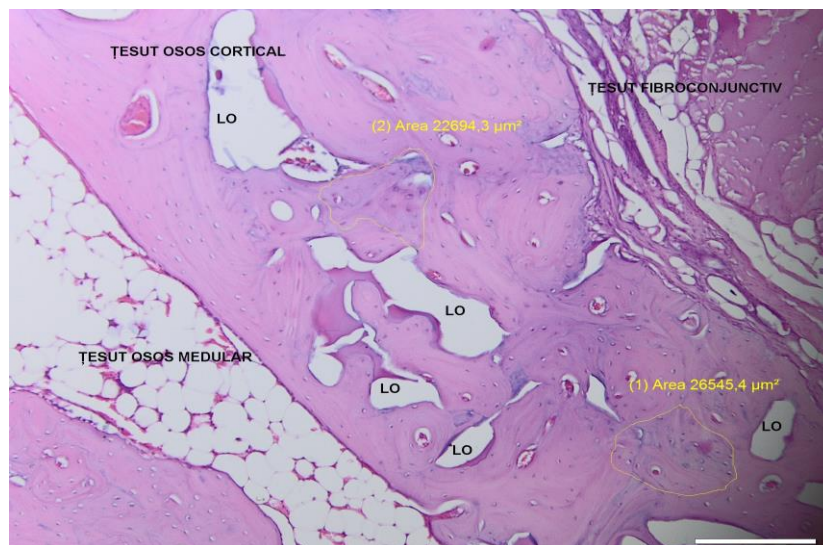


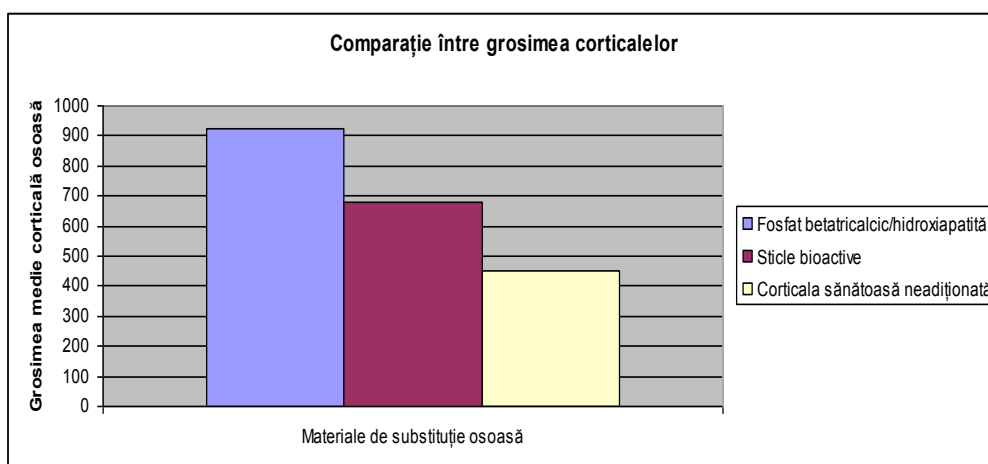
Fig. 5. 9 Secțiune transversală prin tibie în zona de adiție cu sticle bioactive și membrană de PRF. Se observă o corticală dezorganizată cu numeroase travee osoase nou formate cu arii cu număr crescut de osteoblaste și osteocite. Magnificație 10x.

Timpul de resorbție al particulelor de material de adiție osoasă a fost mai rapid decât timpul necesar organismului gazdă de a forma os nou. Astfel, au rezultat spații optice la nivelul corticalei adiționate, fiind evidente la microscopia optică (Fig. 5.13), dar și în imaginile radiologice. Noul țesut osos cortical are o structură neomogenă, dezorganizată datorită numeroaselor lacune osoase, în care nu s-a apozitionat os nou, dar și datorită particulelor de material de adiție osoasă care nu s-au resorbit și care sunt înconjurate doar de niște lamele subțiri de țesut osos.

Grosimea corticalei tibiei animalului de experiență a fost mai mare în zona adiționată raportat la o zonă de corticală normală negrefată. Astfel, grosimea medie a corticalei neadiționate este de **452,4  $\mu\text{m}$**  (Fig. 5.14), grosimea medie a corticalei osoase în zona de adiție cu sticle bioactive este de **681  $\mu\text{m}$** , iar grosimea medie a corticalei în zona de adiție cu mix fosfat betatricalcic/hidroxiapatită este de **925,7  $\mu\text{m}$** . S-a obținut o lățime mai mare a țesutului osos cortical pentru acest din urmă material (Fig. 5.15), probabil și pentru că particulele de fosfat betatricalcic/hidroxiapatită s-au resorbit foarte puțin, ele regăsindu-se în zona adiționată la finalul studiului (grafic 5.2).

Deși grosimea corticalei osoase a fost mai mare în zonele adiționate, raportat la o zonă de corticală osoasă sănătoasă, calitatea ei este scăzută prin prezența geodelor osoase în care nu s-a format os nou, deși particulele din materialul de adiție osoasă s-au resorbit (Fig. 5.16).

Materialele de adiție osoasă au fost integrate la nivelul situsului receptor, având lamele subțiri de os nou format printre particule (Fig. 5.17). Aceste granule grefate nu aveau tendința de a se desprinde de țesutul osos cortical receptor, făcând corp comun cu acesta. A existat o singură excepție la care prin resorbția prea rapidă a membranei de PRF o parte din particulele materialului de adiție osoasă (fosfat betatricalcic/hidroxiapatită) au trecut în părțile moi declanșând o reacție inflamatorie gigantocelulară (Fig.5.20).



Grafic 5.2 Grosimea corticalelor osoase în zonele adiționate și în zona neadiționată

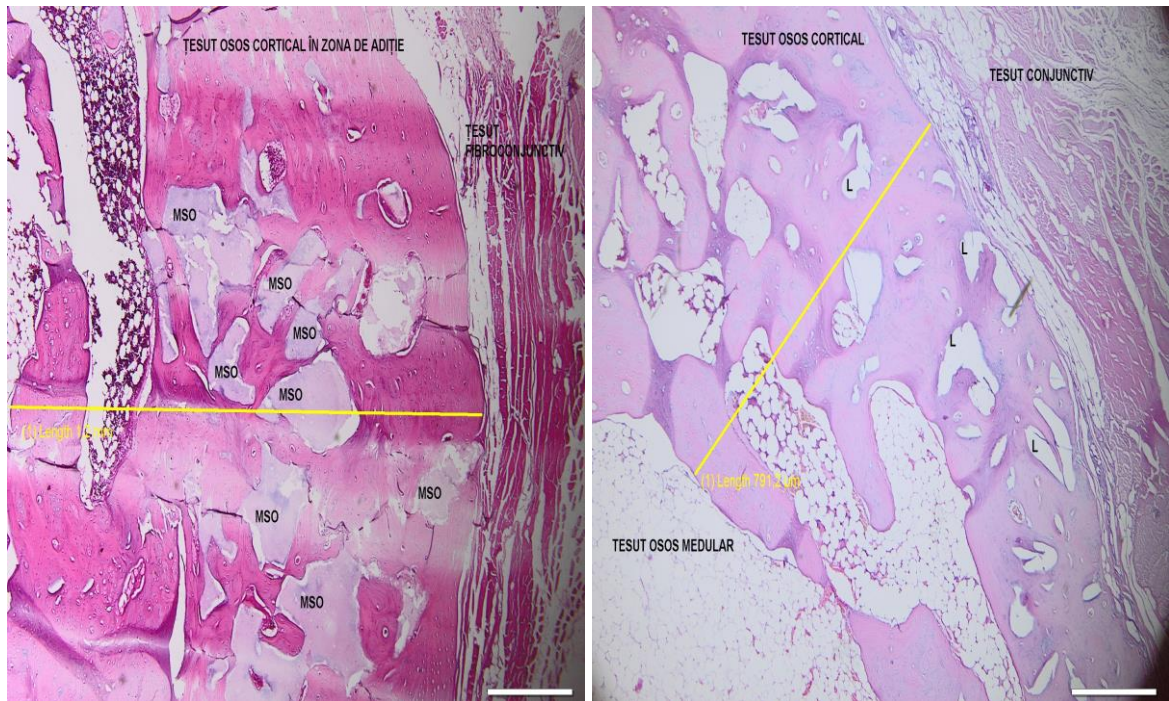


Fig. 5.15 Secțiune transversală prin tibie în zona de adiție cu fosfat betatricalcic/hidroxiapatită (MSO) (prima imagine) și sticle bioactive (a doua imagine). Se observă particulele de material de adiție osoasă integrate în corticala osoasă. Magnificație 4x.

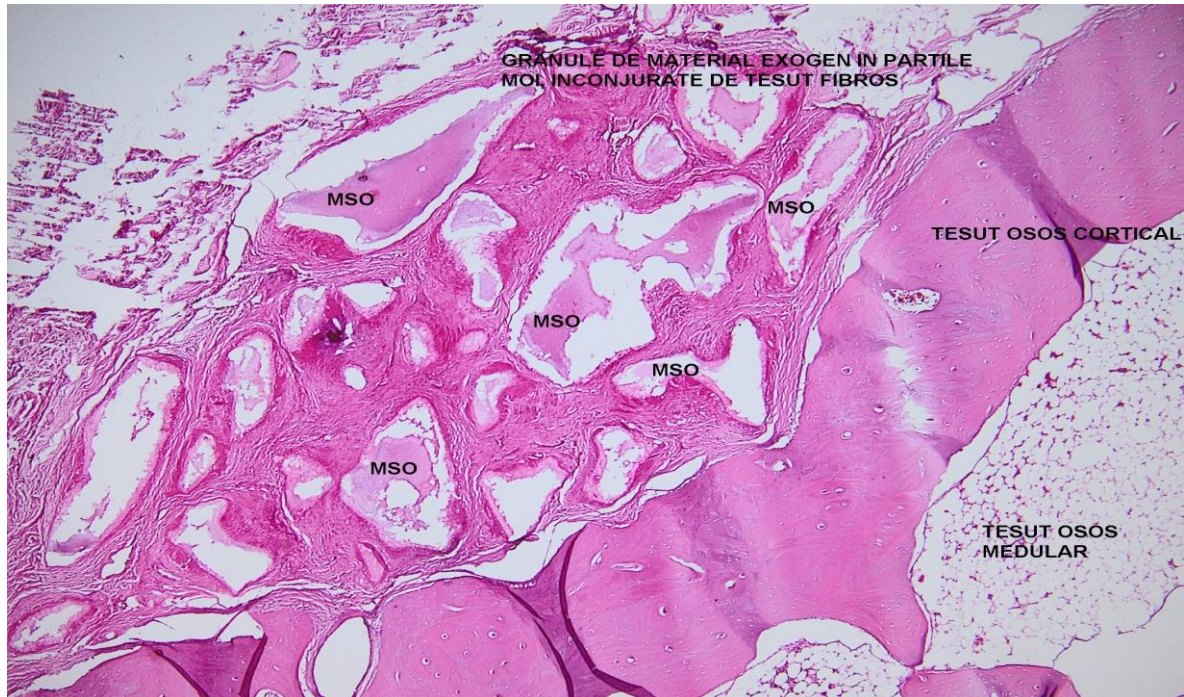


Fig. 5.20 Secțiune transversală prin tibie în zona adiționată cu fosfat betatricalcic/hidroxiapatită (MSO) și membrană de PRF. Se observă particulele de material exogen cum sunt localizate în părțile moi, cu reacție inflamatorie cronică gigantocelulară la periferie. Magnificație 4x.

Zonele de corticală adiționate cu materiale de adiție osoasă au fost investigate și radiologic la trei zile postoperator și după șase luni, la finalizarea studiului. Aceste materiale aloplastice sunt materiale radioopace ce pot fi ușor identificate prin examen radiologic. Se observă fosfatul betatricalcic/hidroxiapatită și sticlele bioactive la nivelul situsului receptor care este treimea proximală a tibiei stângi, la prima radiografie făcută imediat postoperator. După finalizarea celor șase luni pe imaginile radiologice se identifică prezența materialului aloplastic fosfat betatricalcic/hidroxiapatită, aproape în aceeași cantitate ca în radiografia precedentă (Fig. 5.21), spre deosebire de sticlele bioactive care par a se fi resorbit, fiind vizibile doar într-o mică zonă (Fig. 5.22).

De asemenea, în cazul ambelor materiale se poate observa o dedublare a corticalei osului tibial, care nu apare la prima radiografie, fiind evidentă la finalul studiului. Această dedublare lasă niște lacune osoase în structura corticalei, lacune pe care nu le identificăm la osul cortical tibial normal, de la cealaltă tibie a animalului de experiență (Fig. 5.23). Lacunele osoase sunt asemănătoare din punct de vedere radiologic cu structura țesutului osos medular, dar ele ca și consecință clinică vor scădea rezistența osului cortical și implicit a osului tibial în întregime.

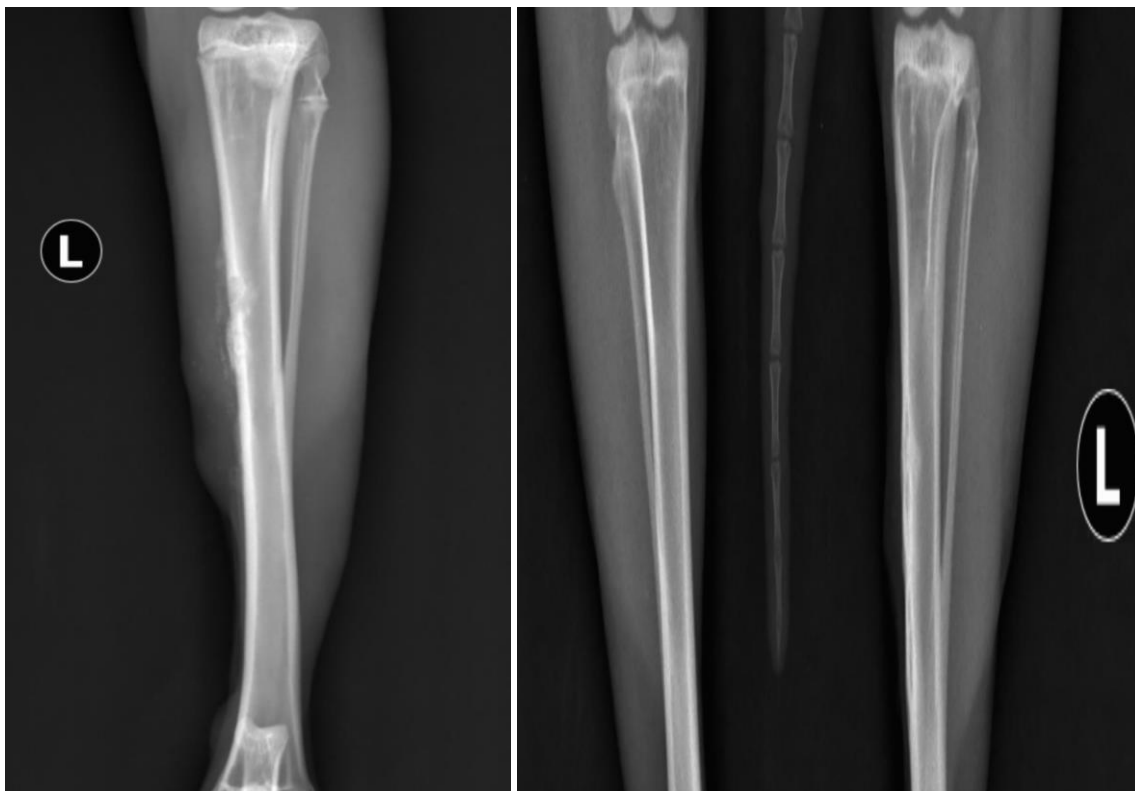


Fig. 5.22 Imagine radiologică a tibiei adiționate cu sticle bioactive la trei zile (prima imagine) și la șase luni (a doua imagine) de la intervenția chirurgicală.

## 6. Concluzii generale

- ❖ Numărul și densitatea celulelor osteoformatoare (osteoblaste și osteocite) sunt mai crescute în cazul osului bovin, mai reduse pentru grefa compozită fosfat betatricalcic/hidroxiapatită și cel mai scăzute pentru sticlele bioactive
- ❖ Osul autolog a prezentat cea mai clară densitate de celule osteoformatoare pe imaginile histopatologice
- ❖ Materialele de adiție osoasă au prezentat grade variabile de resorbție, niciunul nefiind resorbit complet la finalul studiului
- ❖ Modul de resorbție al particulelor din materialul de adiție osoasă a fost de la periferia granulelor spre centrul acestora
- ❖ Spațiile de unde s-a resorbit materialul grefat nu au fost înlocuite de os nou format
- ❖ Prin resorbția granulelor de material de adiție osoasă au rezultat lacune osoase (spații optic vide) la nivelul corticalei osoase care nu au fost umplute cu os nou
- ❖ Activitatea osteoformatoare a fost mai accentuată în jurul particulelor de material grefat
- ❖ Timpul de resorbție al materialelor aloplastice a fost mai rapid decât timpul necesar organismului gazdă de a produce os nou
- ❖ Corticala osoasă în zona adiționată a avut o structură neomogenă prin particulele de material grefat neresorbite
- ❖ Grosimea corticalei de neoformație în zona adiționată cu materiale de adiție osoasă a fost mai mare comparativ cu corticala normală
- ❖ Grosimea medie a corticalei în zona de adiție cu greafă compozită fosfat betatricalcic/hidroxiapatită și membrană de PRF este mai mare decât grosimea medie a corticalei osoase în zona de adiție cu sticle bioactive și membrană de PRF
- ❖ Particulele de material de adiție osoasă care au ajuns în părțile moi au determinat o reacție inflamatorie cronică
- ❖ Radiologic se observă o dedublare a corticalei osoase din zona adiționată cu materiale aloplastice după cele șase luni ale experimentului
- ❖ Grefa compozită fosfat betatricalcic/hidroxiapatită se identifică radiologic neresorbită, aproape în aceeași cantitate ca în ziua intervenției, după cele șase luni
- ❖ Sticlele bioactive din punct de vedere radiologic par a se fi resorbit aproape complet

- ❖ Densitatea și numărul de celule osteoformatoare sunt mai mari în cazul membranei de colagen, urmată apoi de membrana de d-PTFE
- ❖ Osul nou format sub membranele de acoperire a fost identificat doar în jurul particulelor de material de adiție osoasă, având aspect de os imatur
- ❖ Osul nou format nu a fost identificat în vecinătatea membranei de d-PTFE la niciunul din speciamele din studiu, chiar a existat un spațiu între această membrană și patul receptor (osul cortical tibial)
- ❖ Într-un singur caz s-a putut identifica formarea de os nou deasupra membranei de d-PTFE, practic a fost înconjurată de țesut osos matur
- ❖ Distanța dintre osul nou format și membranele de colagen și PRF nu s-a putut măsura, aceste membrane fiind complet resorbite după cele șase luni, țesutul fibroconjunctiv venind în contact direct cu zona de corticală adiționată
- ❖ Prin resorbția prea rapidă a membranelor de colagen și PRF o parte din particulele materialului de adiție osoasă au trecut în părțile moi și au declanșat o reacție inflamatorie
- ❖ În cazul membranelor resorbabile nu s-a putut detecta dacă au mai rămas porțiuni de membrană prezente la sfârșitul studiului
- ❖ Materialele de adiție osoasă au avut grade asemănătoare de resorbție a particulelor sub cele trei tipuri de membrane, nefiind influențate de acestea

## Bibliografie

1. Urist MR, O'Conner BT, Burwell RG. *Bone Graft, Derivatives and Substitutes*. Oxford, Butterworth Heinemann, 1994
2. Flati G, Di Stanislao C. Chirurgia nella preistoria: parte I. *Provincia Med Aquila* 2:8-11, 2004
3. de Boer HH. The history of bone grafts. *Clin Orthop Relat Res* 226:292-298, 1988
4. De Long WG Jr, Einhorn TA, Koval K. Bone grafts and bone graft substitutes in orthopaedic trauma surgery: a critical analysis. *J Bone Joint Surg Am* 89:649-658, 2007
5. Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science* 150:893-899, 1965
6. Sarkar SK, Lee BT. Hard tissue regeneration using bone substitutes: an update on innovations in materials. *Korean Journal Intern Med* 30:279-293, 2015
7. Lieberman JR, Friedlaender GE. *Bone Regeneration and Repair: Biology and Clinical Applications*. Humana Press, Totowa, NJ, USA, 21-44, 2005
8. Burg KJ, Porter S, Kellam JF. Biomaterial developments for bone tissue engineering. *Biomaterials* 21:2347-2359, 2000
9. Goff T, Kanakaris NK, Giannoudis PV. Use of bone graft substitutes in the management of tibial plateau fractures. *Injury* 44(1):86-94, 2013
10. Ricciardi BF, Bostrom MP. Bone graft substitutes: claims and credibility. *Semin Arthroplast* 24:119-123, 2013
11. Hammerle CH, Jung RE, Yaman D, Lang NP. Ridge augmentation by applying bioresorbable membranes and deproteinized bovine bone mineral: a report of twelve consecutive cases. *Clin Oral Implants Res* 19:19, 2008
12. Carlino P, Pepe V, Pollice G, Grassi FR. Immediate transmucosal implant placement in fresh maxillary and mandibular molar extraction sockets: description of technique and preliminary results. *Minerva Stomatol* 57:471, 2008
13. Friedmann A, Dehnhardt J, Kleber BM, Bernimoulin JP. Cytobiocompatibility of collagen and ePTFE membranes on osteoblast-like cells *in vitro*. *Journal Biomed Mater Res A* 86:935, 2008
14. Taschieri S, Del Fabbro M, Testori T, Weinstein R. Efficacy of xenogeneic bone grafting with guided tissue regeneration in the management of bone defects after surgical endodontics. *Journal Oral Maxillofac Surg* 65:1121, 2003

15. Gher ME, Quintero G, Assad D. Bone grafting and guided bone regeneration for immediate dental implants in humans. *Journal Periodontol* 65:881-891, 1994
16. Wang HL, Boyapati L. "PASS" principles for predictable bone regeneration. *Implant Dent* 15:8-17, 2006
17. Oltramari PV, de Lima Navarro R, Henriques JF, Taga R. Orthodontic movement in bone defects filled with xenogenic graft: an experimental study in minipigs. *Am Journal Orthod Dentofacial Orthop* 131:310, 2007
18. Kao ST, Scott DD. A review of bone substitutes. *Oral Maxillofacial Surg Clin North Am* 19:513, 2007
19. Geurs NC, Korostoff JM, Vassilopoulos PJ, Kang TH. Clinical and histologic assessment of lateral alveolar ridge augmentation using a synthetic long-term bioabsorbable membrane and an allograft. *Journal Periodontol* 79:1133, 2008
20. Hartwing BA, Hench LL. The epitaxy of poly-L-alanine on L-quartz and a glass-ceramic. *Journal Biomed Mater Res* 6:413, 1972
21. Khoury F, Buchmann R. Surgical therapy of peri-implant disease: A 3-year follow-up study of cases treated with 3 different techniques of bone regeneration. *Journal Periodontol* 72:1498–1508, 2001
22. Esposito M, Grusovin MG, Kwan S, Worthington HV, Coulthard P. Interventions for replacing missing teeth: Bone augmentation techniques for dental implant treatment. *Cochrane Database Syst Rev* pub3, 2008
23. Liu J, Kerns DG. Mechanisms of guided bone regeneration: A review. *Open Dent Journal* 8:56–65, 2014
24. Schropp L, Wenzel A, Kostopoulos L, Karring T. Bone healing and soft tissue contour changes following single-tooth extraction: A clinical and radiographic 12-month prospective study. *Int J Periodontics Restor Dent* 23:313–323, 2003
25. Carlsson GE, Thilander H, Hedegard B. Histologic changes in the upper alveolar process after extractions with or without insertion of an immediate full denture. *Acta Odontol Scand* 25:21–43, 1967
26. Sheikh ZA, Javaid MA, Abdalla N. *Bone replacement graft materials in dentistry. In Dental Biomaterials (Principle and Its Application)* Paramount Publishing Enterprise. Karachi, Pakistan, 2 ed, 2013
27. Von Arx T, Buser D. Horizontal ridge augmentation using autogenous block grafts and the guided bone regeneration technique with collagen membranes: A clinical study with 42 patients. *Clin Oral Implant Res* 17:359–366, 2006

28. Rocuzzo M, Ramieri G, Bunino M, Berrone S. Autogenous bone graft alone or associated with titanium mesh for vertical alveolar ridge augmentation: A controlled clinical trial. *Clin Oral Implant Res* 18:286–294, 2007
29. Von Arx T, Hardt N, Wallkamm B. The time technique: A new method for localized alveolar ridge augmentation prior to placement of dental implants. *Int Journal Oral Maxillofac Implant* 11:387–394, 1996

## LISTA CU LUCRĂRILE ȘTIINȚIFICE PUBLICATE

Neculae II, Angheliescu VM, Zurac S, Dinca O, Vladan C, Bucur A. Use of collagen, PTFE and PRF membrane in bone reconstruction an experimental and histomorphometric study. *J Transl Med Res* 2017;22(1):32-36

<https://www.sgo-iasgo.com/article/use-of-collagen,-ptfe-and-prf-membranes-in-bone-reconstruction-an-experimental-and-histomorphometric-study>

Neculae II, Angheliescu MV, Zurac S, Dinca O, Vladan G, Bucur A. bone regeneration by means of bioactive glasses – an experimental study. *Medicine in evolution* 2017;23(4):446-451

[http://medicineinevolution.umft.ro/2017\\_.htm](http://medicineinevolution.umft.ro/2017_.htm)