

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE

„CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI

ȘCOALA DOCTORALĂ

DOMENIUL

MEDICINA DENTARA

**STUDIUL PRIVIND EFICACITATEA REMODELĂRII OSOASE ÎN URMA AUGMENTĂRII OSOASE CU
HIDROXIAPATITĂ BOVINĂ, FOSFAT BETA-TRICALIC ȘI STICLE BIOACTIVE**

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător de doctorat:

PROF. UNIV. DR. ALEXANDRU BUCUR

Student-doctorand:

ANGHELESCU VLAD-MARIAN

2018

Cuprins

Introducere

I. Partea generală

- 1. Principii biologice în augmentarea osoasă.....pag.13**
 - 1.1. Scurt istoric al metodelor de mărire a ofertei osoase.....pag.13
 - 1.2. Clasificarea materialelor de augmentare a defectelor osoase cavitare.....pag.16
 - 1.3. Defecte osoase în teritoriul oro-maxilo-facial care pot fi reconstruite prin augmentare osoasă.....pag.17
 - 1.4. Diferențe între augmentare, adiție și interpoziție osoasă.....pag.25
- 2. Caracteristici biologice și clinice ale materialelor folosite în mărirea ofertei osoase..... pag.27**
 - 2.1. Diferențe între materialele aloplastice și materialele biologice.....pag.27
 - 2.2. Factori ce influențează integrarea grefelor în funcție de tipul grefei.....pag.29
 - 2.3. Structura fizică și moleculară a materialelor de mărire a ofertei osoase..... pag.33
 - 2.4. Materiale aloplastice utilizate în reconstrucția defectelor osoase..... pag.37
 - 2.5. Materiale biologice utilizate în reconstrucția defectelor oro-maxilo-faciale..... pag.42
- 3. Membrane resorbabile și neresorbabile utilizate ca barieră în augmentarea osoasă.....pag.46**
 - 3.1. Caracteristicile generale comune ale membranelor biologice.....pag.46
 - 3.2. Membrane resorbabile versus membrane neresorbabile.....pag.55

II. Partea specială

- 4. Studiu asupra histomorfometriei materialului biopsic recoltat din zona de augmentare osoasă conținând hidroxiapatita bovină, fosfat beta-tricalic și sticle bioactivepag.58**
 - 4.1. Obiectivele studiului.....pag.58
 - 4.1.1 Animalele de experiență.....pag.59
 - 4.2. Material și metodă.....pag.64
 - 4.2.1. Procedeu chirurgicalpag.67
 - 4.2.2. Metodele de prelevare și prelucrare a materialului biopsic și histotehnica osului.....pag.73
 - 4.2.3 Tipul de colorație.....pag.75
 - 4.3. Rezultate.....pag.77

4.4. Discuții.....	pag.100
4.5. Concluzii.....	pag.102
5. Studiu asupra expresiei moleculei de adeziune a celulelor endoteliale plate (PECAM-1/CD31) ca marker angiogenetic în augmentarea osoasă a celor trei tipuri diferite de biomateriale.....	pag.103
5.1. Obiectivele studiului.....	pag.103
5.2. Material și metodă.....	pag.104
5.2.1. Imunomarcarea cu Pecam-1/CD31.....	pag.107
5.3. Rezultate.....	pag.109
5.4. Discuții.....	pag.133
5.5. Concluzii.....	pag.135
6. Studiul histopatologic asupra utilizării unor materiale de mărire a ofertei în asociere cu membrana de PTFE și colagen în augmentarea osoasă.....	pag.137
6.1. Obiectivele studiului.....	pag.137
6.2. Material și metodă.....	pag.138
6.3. Rezultate.....	pag.139
6.4. Discuții.....	pag.150
6.5. Concluzii.....	pag.152
7. Concluzii.....	pag.153
Bibliografiel.....	pag.155
Anexe.....	pag.179

Introducere

Atrofia oaselor maxilare și prezența unor defecte osoase ce apar ca urmare a unor traumatisme sau rezecții osoase datorate diverselor patologii din sfera oro-maxilo-facială reprezintă o provocare continuă din punct de vedere terapeutic, iar augmentarea osoasă este adesea esențială pentru a permite refacerea funcționalității, esteticii și pentru a realiza inserarea unor implanturi dentare. Augmentarea osoasă este necesară atunci când există un defect osos cavitat, iar lățimea și înălțimea crestei alveolare reziduale a pacientului edentat parțial sau total este insuficientă. Utilizarea de grefe osoase autogene rămâne metoda cea mai recunoscută de augmentare.

Au fost dezvoltate diferite metode de mărire a ofertei osoase în ultimii 30 de ani. Aceste tehnici au fost folosite cu diferite modificări, atât în ceea ce privește site-ul donator, arhitectura grefei osoase, cât și momentul inserării grefei și a implantului.

Acest studiu este în concordanță cu tendințele actuale de cercetare atât experimentale cât și clinice de a dezvolta atât noi metode de augmentare osoasă cât și de a le înțelege și aprofunda pe cele existente, acestea fiind utilizate atât în chirurgia oro-maxilo-facială cât și în implantologie

Ipoteza de la care s-a plecat în acest studiu a constat din faptul că în experiența clinică, rezultatele obținute în urma augmentării cu diferite materiale de mărire a ofertei osoase nu au fost întotdeauna în concordanță cu indicațiile producătorului. Rezultatele clinice obținute în astfel de procedee fiind impredictibile.

Astfel s-a urmărit cercetarea la nivel histopatologic atât a modului în care se produce osificarea, a cantității de os nou format în jurul particulelor și a arhitecturii acestuia, pentru a putea concluziona asupra oportunității utilizării acestor tipuri de materiale în practica curentă.

Ca animal de experiment, în studiul de față s-a folosit iepurele, iar materialele de augmentare osoasă utilizate au fost hidroxiapatita bovină, fosfatul beta-tricalic și sticlele bioactive.

Studiul a fost realizat pe 20 de iepuri maturi, din rasa New Zealand White (10 masculi și 10 femele), cu o greutate de aproximativ 2,5 kg. Protocolul de studiu și schema experimentală au fost aprobate de INCDMI Cantacuzino București.

Iepurele ca animal de studiu este unul dintre cele mai frecvent utilizate pentru cercetarea medicală, fiind folosit în aproximativ 35% din studiile de cercetare musculo-scheletale) [1]. Acest lucru se datorează în mare parte ușurinței de manipulare și dimensiunii. Iepurele este, de asemenea, convenabil, deoarece ajunge la maturitatea scheletică la scurt timp după maturitatea sexuală, la aproximativ vârsta de 6 luni . [2]. Motivul acestui deziderat este reprezentat în cea mai mare parte de ușurința de manipulare cat si de dimensiunile reduse ale acestuia. Iepurele este, de asemenea, un animal cu o rata crescuta a utilizarii experimentale, deoarece ajunge la maturitatea scheletică la scurt timp după maturitatea sexuală, la aproximativ vârsta de 6 luni.

Cu toate acestea, în ceea ce privește evaluarea mai multor tipuri de biomateriale, putem spune că dimensiunile reduse ale iepurilor reprezintă principalul dezavantaj al studierii măririi ofertei osoase pe aceștia

La toate animalele de experiență s-au realizat defecte osoase la nivelul tibiei. Acestea au fost augmentate cu hidroxiapatită bovină, fosfat beta-tricalcic (TCP) și cu biosticlă. În două defecte augmentarea s-a făcut cu osul autolog obținut prin forarea geodelor intracorticale. Pentru a nu permite pătrunderea țesutului conjunctiv în spațiile create de biomateriale, s-au aplicat membrane pentru a obține o barieră. După aplicarea membranelor, sutura a fost realizată în trei planuri (periost, țesut muscular și tegument).

Scopul tezei de doctorat, prin cercetarea experimentală de față, a fost evaluarea osului la implantarea în defectul creat iatrogen la animale de laborator a trei tipuri de substituenți osoși și aprecierea mecanismului de regenerare a defectelor osoase create.

Pentru realizarea acestui studiu a fost necesara colaborarea interdisciplinara atat cu medicii veterinari din cadrul INCDMI Cantacuzino București cat si cu departamentul de Histopatologie al Spitalului Universitar Colentina Bucuresti

Acest studiu experimental pe model animal a presupus o metodologie de cercetare ce a necesitat atât realizarea intervențiilor chirurgicale la nivelul tibiei a 20 de iepuri în rasă New Zealand White cât și realizarea studiilor histopatologice din zonele de interes

Măsurătorile au fost realizate cu ajutorul microscopului optic, iar histomorfometria a fost efectuată utilizând un microscop. Pentru analizarea statistică a datelor a fost utilizat Software-ul statistic SPSS 22. Analiză descriptivă a fost utilizată pentru evaluarea primară.

În acest studiu, secțiunile osoase ale animalelor de experiență din zona de interes au fost evidențiate pe lame simple, cu ajutorul colorațiilor pe bază de hematoxină-eozină (HE)

cât și prin colorații imunohistochimice. Testele imunohistochimice (IHC) s-au realizat pentru molecula PECAM-1/CD31.

Analiza celulelor endoteliale s-a realizat prin analiza adeziunii celulelor endoteliale la plachete cu markerul (PECAM/CD31), care este puternic exprimat de către celulele endoteliale.

Examinarea microscopică a diapozitivelor a fost efectuată utilizând un microscop Nikon Eclipse 80i, iar fotografiile au fost obținute utilizând o cameră digitală atașată la un calculator

Pentru a evalua distribuția asimetrică a datelor s-au folosit testele Kurtosis și Skewness. Pentru aprecierea normalității au fost realizate testele Kolmogorov-Smirnov și Shapiro-Wilk

În scopul realizării acestui deziderat, s-au urmărit trei direcții de cercetare pentru a evalua cât mai bine datele și pentru a putea corela cu experiența clinică rezultatele obținute.

Astfel, s-au urmărit:

- Gradul de integrare osoasă a materialelor de augmentare în urma implantării acestora la nivelul tibiei animalului de laborator. Acest lucru s-a realizat prin histomorfometrie și prin analiză statistică a măsurătorilor obținute.
- Analiza capacității de integrare a substituenților osoși prin evaluarea angiogenezei, așa cum a fost demonstrată prin evaluarea expresiei imunohistochimice a moleculelor de adeziune a celulelor endoteliale plate (PECAM-1/CD31) în vecinătatea grevelor osoase.
- Capacitatea de integrare a substituenților osoși prin analiză descriptivă și histomorfometrie a trei tipuri de substituenți osoși, în asociere cu membrane resorbabile și neresorbabile în augmentarea osoasă.
- Evaluarea riscurilor și complicațiilor legate de cele două tipuri de grefe.

Pentru realizarea obiectivelor propuse au fost necesare studiul anatomiei membrului inferior al iepurelui de laborator, aprofundarea tehnicilor histopatologice de realizare a preparatelor obținute, cât și analiza acestora la microscopul optic.

În urmă realizării studiului, după urmărirea celor trei direcții de cercetare se poate concluziona faptul că cele trei materiale, reprezentate de hidroxiapatita bovină (BioOss); fosfatul beta-tricalic (Cerasorb) și sticla bioactivă (Perioglass), acționează ca o matrice osteoconductoare, însă nu au capacitate osteoinductivă de formare osoasă de novo.

Tiparul de neoapozitie endogenă, manifestat în principal la nivelul corticalei, confirmă direcția de depunere a țesutului de neoformație dinspre periferie, spre zona centrală a defectului, fenomen caracteristic osteoconducției

Cele trei materiale de augmentare osoasă nu se resorb deși turnoverul osos la modelul animal utilizat față de om este de trei ori mai rapid. Reducerea în dimensiuni a hidroxiapatitei bovine (BioOss), fosfatului beta-tricalic (Cerasorb) și sticlei bioactive (Perioglass), a produs în perioada studiată o serie de spații libere între osul nou format și acestea, sub formă unor spații optice se vede la nivel histopatologic, scăzând rezistența osoasă

În cazul tuturor celor trei materiale de augmentare, putem afirma că angiogeneza și osteogeneza sunt corelate în mod intim prin faptul că există o tendință spre o activitate mai bună a hidroxiapatitei bovine și a fosfatului beta-tricalcic, comparativ cu sticla bioactivă

În cazul utilizării a două tipuri de membrane, membrana de colagen și membrana de PTFE, am observat că, indiferent de materialul de augmentare folosit, în cazul acoperirii cu membrană resorbabilă de colagen, cantitatea de os nou format în jurul materialului de augmentare a fost sensibil crescută în comparație cu membrana nerresorbabilă PTFE.

În urma studiului nostru, rezultatele obținute au fost în concordanță cu majoritatea studiilor analizate. Studiul nostru a demonstrat beneficiile membranelor de colagen în fața membranelor de PTFE, prin faptul că acestea nu au nevoie de reintervenții chirurgicale de eliminare a membranei, în timp ce potențialul de regenerare osoasă a materialelor de augmentare pe care acestea le acoperă este similar, având ușoare valori crescute în cazul membranei resorbabile.

În majoritatea studiilor citate în literatură datorită capacităților osteoinductive și osteoconductive, autogrefele sunt superioare tuturor celorlalte tipuri de materiale substituente utilizate în mărirea ofertei osoase, la fel ca și în studiul nostru acestea confirmându-și statutul de “standard de aur” în augmentarea osoasă.

Ca și limite ale cercetărilor efectuate ca și în a elabora teza trebuie menționate :

- Utilizarea unei singure specii de animal de experiență
- Dimensiunea defectelor care pot fi realizate este limitată
- Un defect la nivelul tibiei mai mare de 6 mm în diametru pune în pericol rezistența osoasă

- Durata redusă a studiului, care nu a permis evaluarea neoapuziției la minim 1 an de la inserare,
- Perioada în care este posibil să se producă resorbția avansată a materialului de augmentare

Ca și perspective de continuare a cercetărilor putem să notăm faptul că sunt necesare studii clinice prin care să se evalueze eficacitatea pe termen lung a materialelor și evaluarea comportamentului materialelor de augmentare osoasă în raport cu compoziția lor fizico-chimică. De asemenea este necesară verificarea rezultatelor histopatologice pe model animal prin studii clinice.

II. PARTEA SPECIALĂ

4.Studiu asupra histomorfometriei materialului biopsic recoltat din zona de augmentare osoasă conținând hidroxiapatita bovină, fosfat beta-tricalic și sticle bioactive

4.1. Obiectivele studiului

Reconstrucția osoasă, prin modul în care aceasta se poate realiza, cât și prin materialele folosite, reprezintă o preocupare continuă atât în specialitatea chirurgiei oro-maxilo-faciale, cât și în alte specialități.

În mod ideal, un substituent osos ar trebui să îndeplinească următoarele „criterii”: să fie biocompatibil; să aibă suficiente caracteristici mecanice pentru a fi ușor de utilizat și pentru o fixare stabilă; să servească ca o matrice osteoconductivă sau osteoinductivă; să se resoarbă în totalitate și să fie înlocuit de os propriu; să creeze o masă structurală care să poate găzdui implanturi dentare cu o capacitate de încărcare și să reprezinte un suport îndelungat al implantului”. [3]

Au fost efectuate mai multe studii în care au fost tratate diverse defecte osoase, prin aplicarea diferitelor tipuri de grefe osoase [4;5]. În majoritatea cazurilor, grefele osoase autologe au fost sugerate ca fiind standardul de aur, toate celelalte materiale fiind comparate în raport cu acestea [6], obținând niveluri variabile de eficacitate..

Osteoconducția este un proces tridimensional, în care țesutul donor acționează ca o matrice pentru creșterea capilarelor, țesutului perivascular și a celulelor osteoprogenitoare de la nivelul patului receptor [7]

Ținând cont de multitudinea de materiale și biomateriale utilizate în ziua de astăzi în chirurgia oro-maxilo-facială, studiile care să prezinte comparații între nenumăratele tipuri de materiale necesită o cercetare continuă, în primul rând datorită numărului mare de materiale noi apărute pe piață și, în al doilea rând, datorită lipsei unor cercetări pe termen lung.

Obiectivul studiului de față a fost să evalueze și să compare eficacitatea remodelării și osteointegrării a trei tipuri de substituenți osoși [hidroxiapatita bovină (BioOss®), sticlele

bioactive (Perioglass[®]), fosfatul beta-tricalcic (Cerasorb[®])] în urmă augmentării unui defect iatrogen realizat la nivelul tibiei a 20 de iepuri din rasa New Zealand.

În cadrul acestui studiu, s-a urmărit gradul de integrare osoasă a materialului de mărire a ofertei osoase printr-un studiu histomorfometric și histopatologic al zonelor grefate cu cele trei materiale de substituție, în comparație cu osul autolog utilizat ca martor.

Pentru realizarea acestor obiective propuse au fost necesare atât studiul anatomiei membrului inferior al iepurelui de laborator, al instrumentarului util, cât și al modului de realizare a anesteziei pe animalul experimental și a metodelor de eutanasiere în scopul prelevării probelor biohistochimice.

Astfel, a fost necesară însușirea histotehnicii osului, acest lucru implicând eliminarea sărurilor de calciu din țesut fără a altera structurile celulare și fără a diminua capacitatea de vizualizare a detaliilor celulare. Acest lucru s-a realizat prin tehnicile de fixare, decalcificare, includere, secționare și, în final, colorare a lamelor histopatologice cu colorația aleasă - hematoxilină-eozină (HE). După toate acestea, a urmat realizarea măsurătorilor cu ajutorul microscopului optic, iar histomorfometria a fost efectuată utilizând un microscop Olympus CX 30 (Olympus, Japonia), conectat la programul de procesare a imaginilor (Dimension CellSens Olympus, Olympus, Japonia), utilizând camera digitală Olympus DP21 (Olympus, Japonia).

Folosind programul Statistic SPSS 22, au fost realizate testele statistice pentru a putea analiza datele obținute. În faza primară a fost realizată analiza descriptivă. Testele Kurtosis și Skewness au fost utilizate pentru a evalua distribuția asimetrică a datelor, în timp ce pentru loturile independente s-au folosit testele non-parametrice, Kruskal-Wallis și Mann-Whitney.

4.2. Material și metodă

Cercetarea s-a făcut în cadrul Institutului Național de Cercetare-Dezvoltare pentru Microbiologie și Imunologie Cantacuzino București pe un lot de 20 de iepuri maturi, din rasa New Zealand White. Aceștia având o greutate de aproximativ 2,5 kg. Atât Etapele protocolului de studiu cât și schema experimentală au fost puse sub atenția Comisiei de Etică pentru lucrul cu animale de laborator a INCDMI Cantacuzino București. Aceștia avizand pozitiv acest protocol. Pe toată durata cercetării, animalele au fost găzduite în camere ce au avut o temperatură cuprinsă între 18°C și 24°C cât și o umiditate de 55%. Animalele su fost hrănite cu o dietă standardizată. Ele au fost împărțite în trei grupuri egale de câte 6 în funcție de materialul cu care s-a realizat augmentarea

Animalele au fost sacrificate la 180 de zile după intervenție, iar din zonele de interes au fost recoltate fragmentele osoase care ulterior au fost analizate histopatologic.

După sacrificarea animalelor și recoltarea pieselor biopsice din zonele de interes de la nivelul tibiei, am analizat prezența remodelării osoase în noua matrice osoasă din jurul particulelor și gradul de biocompatibilitate a materialului, printr-o analiză cantitativă a nivelului osului nou format.

4.3. Rezultate

Pentru analizarea statistică a datelor a fost utilizat Software-ul statistic SPSS 22. Analiza descriptivă a fost utilizată pentru evaluarea primară. S-au folosit testele Kurtosis și Skewness pentru a evalua distribuția asimetrică a datelor. Pentru aprecierea normalității au fost realizate testele Kolmogorov-Smirnov și Shapiro-Wilk.

De asemenea, a fost utilizat testul non-parametric pentru loturile independente Kruskal-Wallis.

Pentru ușurința introducerii datelor statistice în cadrul realizării testelor în programul SPSS 22, osul bovin a fost numerotat cu '1'; fosfatul beta-tricalcic cu '2'; biosticla cu '3' și osul autolog cu '4'.

Din punct de vedere histomorfometric, în urma analizei statistice descriptive a cantității de țesut osos matur format în jurul materialului de augmentare, s-a observat că, în cazul materialului bazat pe hidroxiapatită bovină, aceasta prezintă o cantitate de os nou format discret mai mare decât în cazul celorlalte materiale, cu o medie de 92,4385 μm , reprezentând grosimea lamelelor de os nou format în jurul particulelor. Fosfatul beta-tricalcic prezintă o medie a grosimii lamelelor osoase nou formate de 73,67 μm , cu un minim de 20,3 μm și un maxim de 230,30 μm . În cazul materialului Perioglass, cantitatea de os nou este semnificativ redusă, cu o medie de 31,88 μm , cu un minim de 9,10 μm și un maxim de 120,6 μm .

Valorile celor trei materiale sunt semnificativ reduse în comparație cu osul autolog folosit ca reper, acesta având o medie de 249,68 μm , cu un minim de 115,3 μm și un maxim de 363,8 μm .

În cadrul realizării analizei statistice, aceasta s-a făcut în prima fază pe toate loturile, apoi pe grupuri de câte două, pentru a vedea unde este diferența statistic semnificativă.

Realizând analiza pe perechi, se poate observa că între fiecare pereche există diferențe semnificative. Luând în calcul și lotul de os autolog reprezentat de lotul control, observăm că nu obținem o diferență majoră comparativ cu lotul reprezentat de hidroxiapatită.

Testele Kurtosis și Skewness relevă o distribuție asimetrică la dreapta, în cazul primului lot, și o distribuție la stânga pentru celelalte două loturi, cu aspect platrictic al curbei.

Folosind testul Kruskal-Wallis, scorul mediu în primul lot a fost de 100,4, urmat de 72,73 pentru grupul fosfat tricalcic și numai 34,01 pentru lotul de sticlă bioactivă. Din analiza statistică am obținut diferență semnificativă între cele trei grupuri, Chi pătrat = 59,323 n la 2 grade libertate cu $p < 0,001$.

. În urma testelor normalității Kolmogorov-Smirnov și Shapiro-Wilk, s-a demonstrat că singurul lot care respectă normalitatea este cel cu os autolog - lotul control.

Acest lucru completează descoperirile în care cantitatea de os care se formează în jurul fosfatului beta-calcic și a hidroxiapatitei bovine este evident superioară sticlelor bioactive.

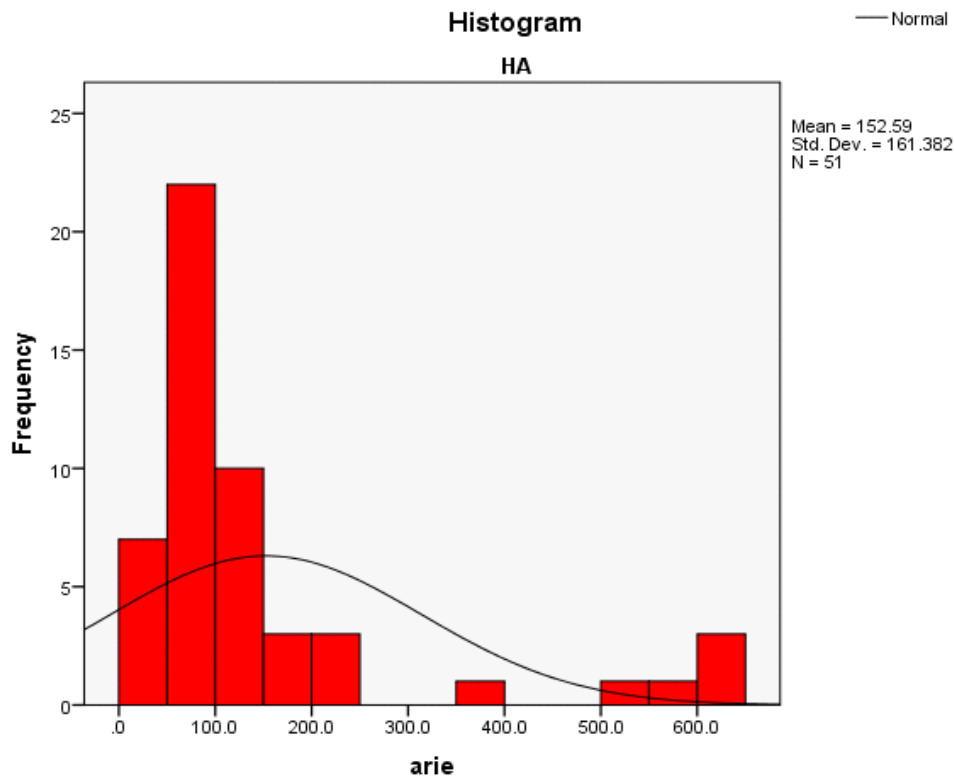


Fig. 4.9. Histogramă prezentând deviația standard și media cantității de hidroxiapatită bovină obținută.

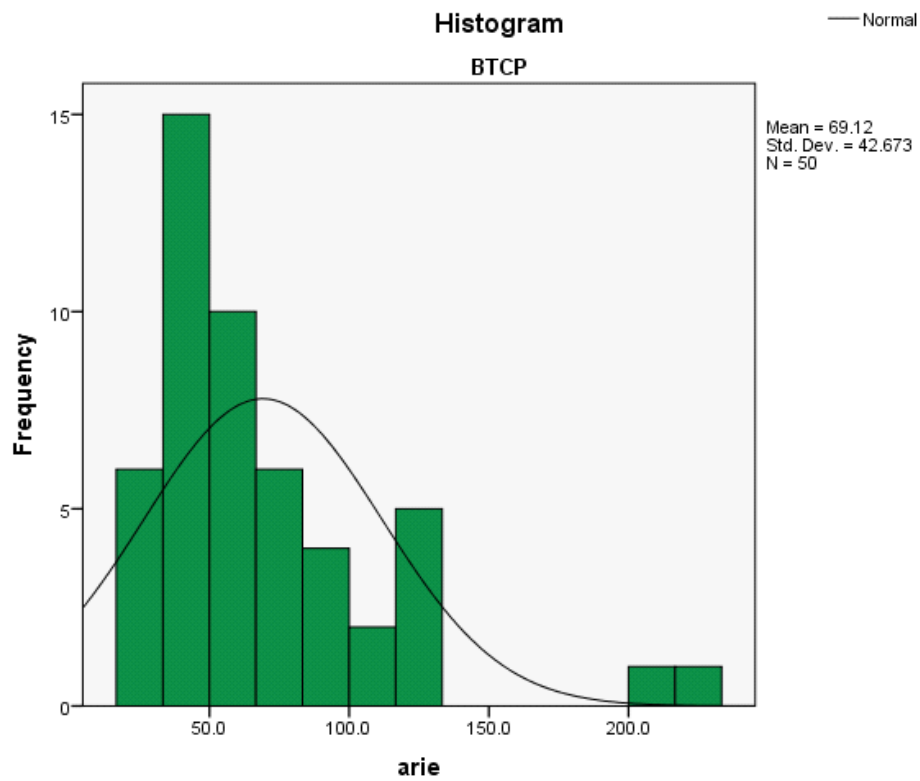


Fig. 4.10. Histogramă prezentând deviația standard și media cantității de beta-TCP obținut.

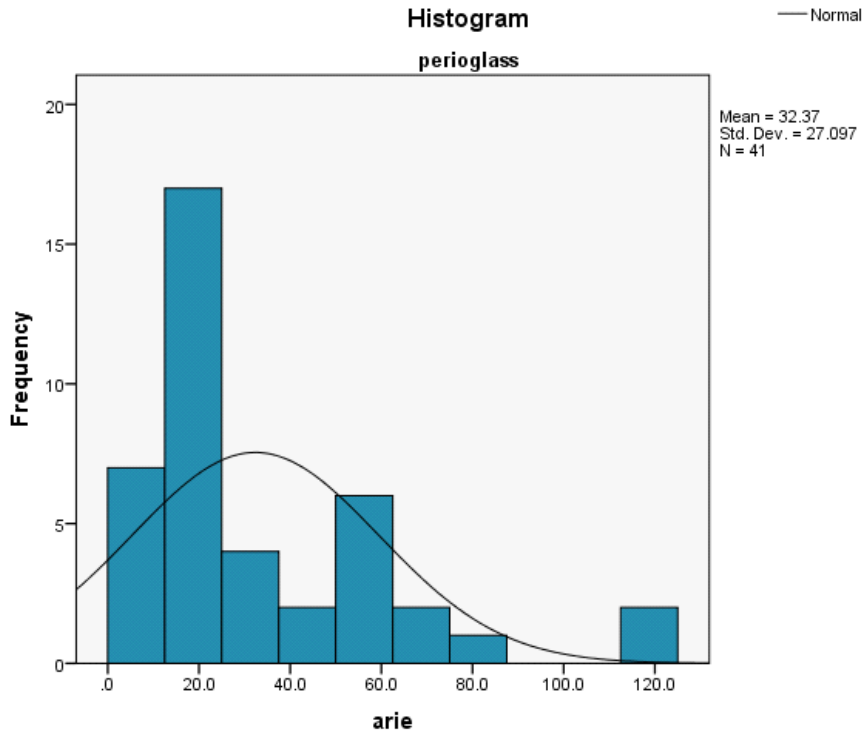


Fig. 4.11. Histogramă prezentând deviația standard și media cantității de sticlă bioactivă obținută.

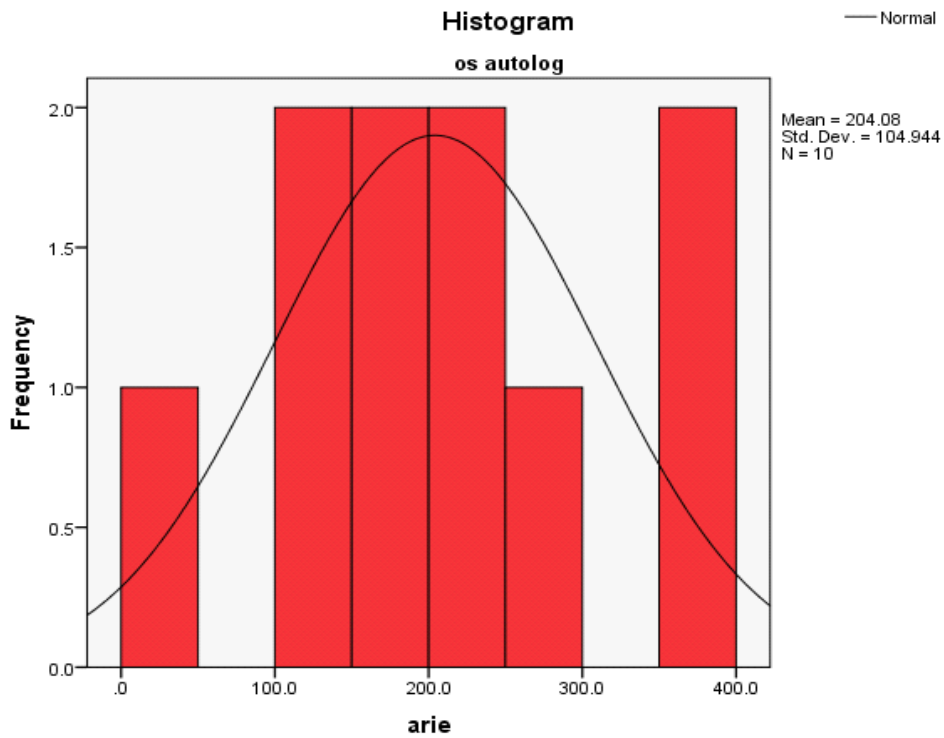


Fig. 4.12. Histogramă prezentând deviația standard și media cantității de os autolog obținut.

Tabelul 4.V.

Valori comparative ale mediei între toate materialele față de osul autolog

Valori			
	Tip_os	N	Mean Rank
Arie	HA	51	103.08
	BTCP	50	74.01
	Perioglass	41	34.54
	Os autolog	10	125.45
	Total	152	

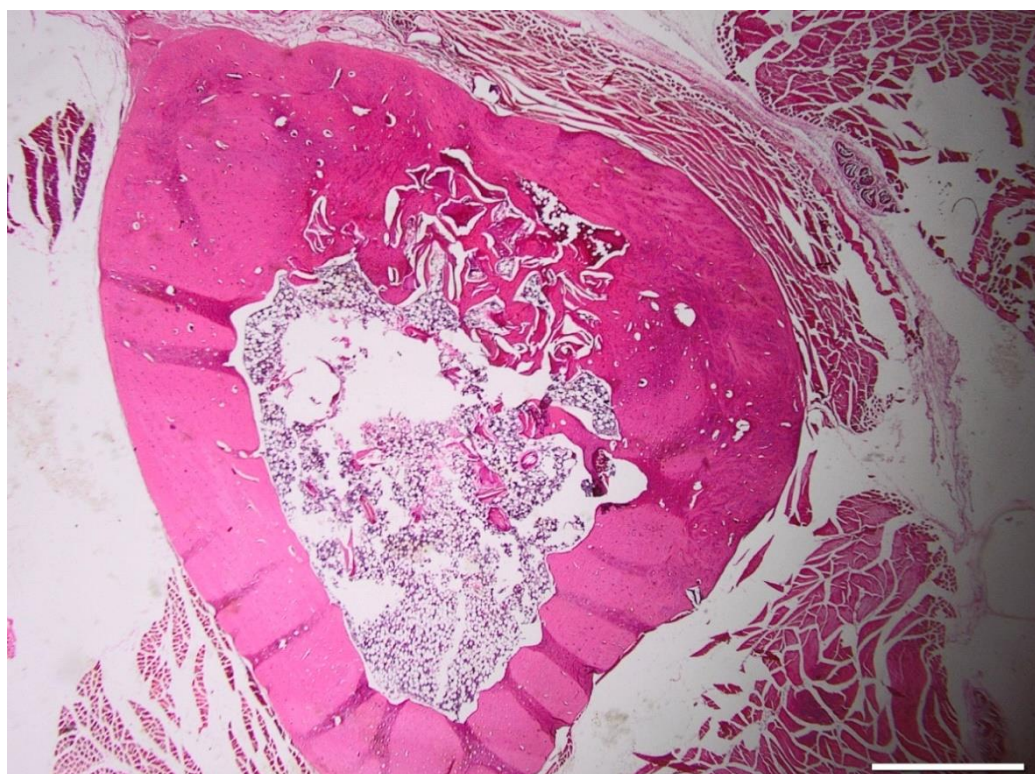


Fig. 4.17. HE;10X(Xenogrefă). Secțiune transversală la nivelul tibiei, cu spațiile medulare ocupate într-o mică măsură de granulele osoase, acestea fiind aglomerate în partea corticală.

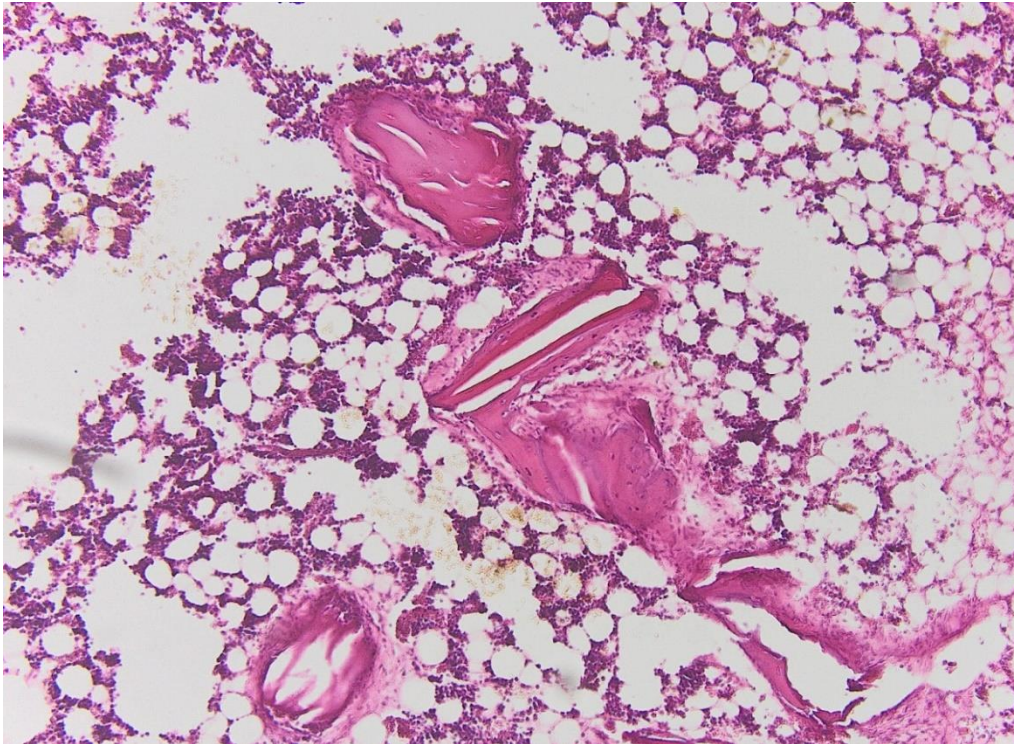


Fig. 4.18. HE;40X(Xenogrefă). Detaliu de la nivelul regiunii interne a osului cortical, prezentând o matrice de os lamelar și fibros în jurul particulelor și zone optic vide în interiorul osului cortical.

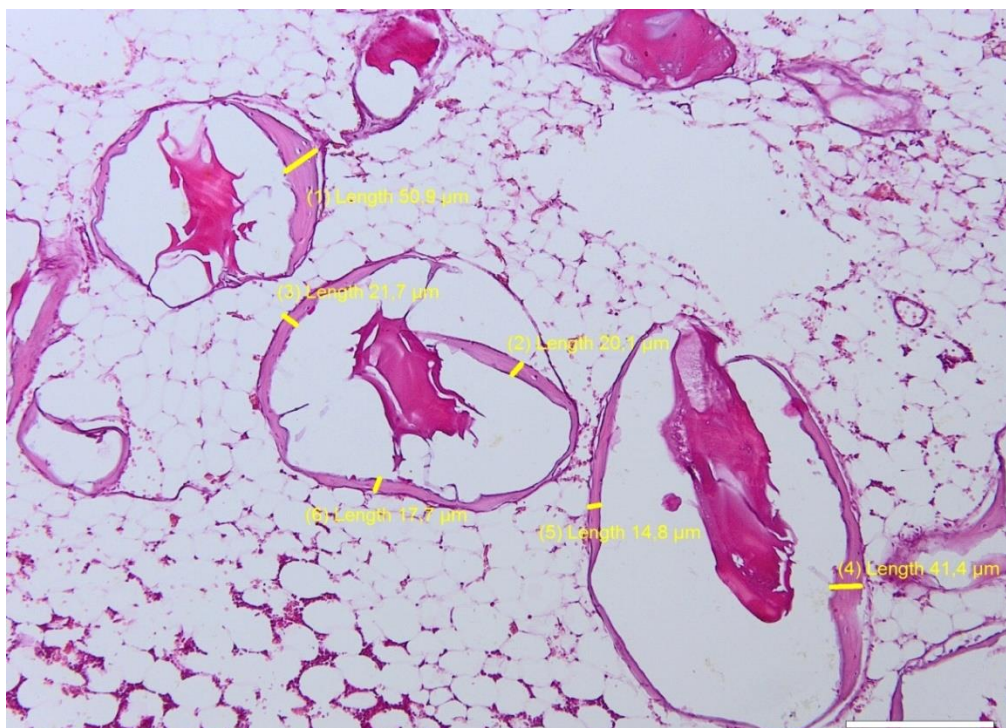


Fig. 4.23. HE;40X(Biosticla). Detaliu de os cortical cu spații optic vide date de resorbția materialului.

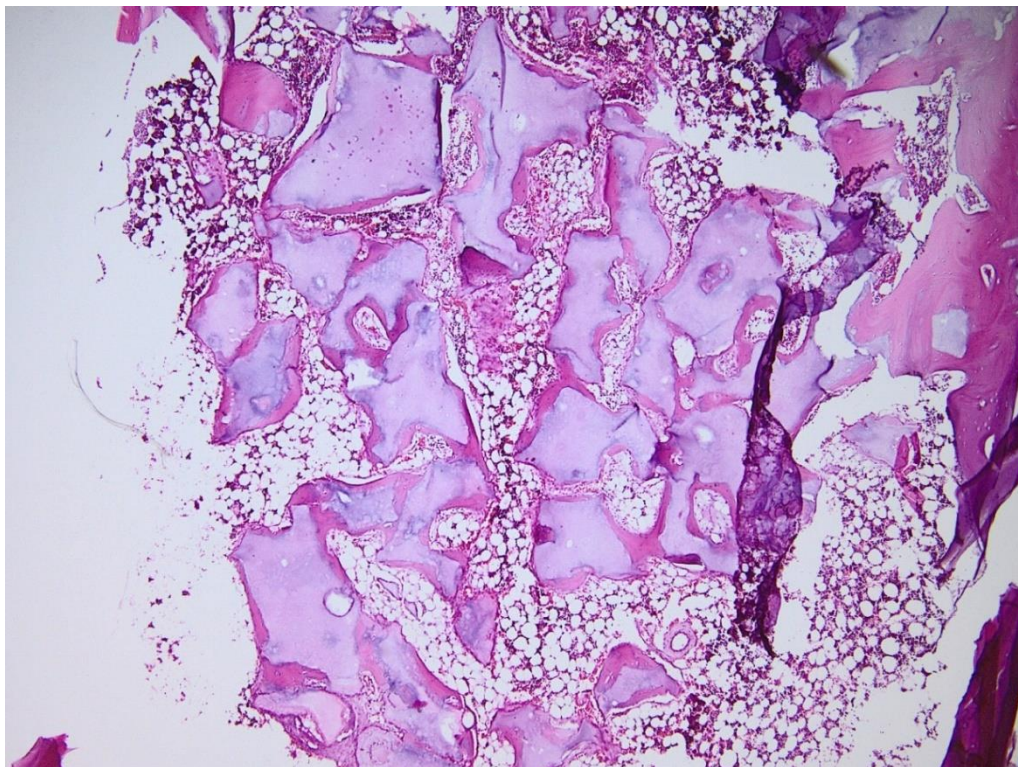
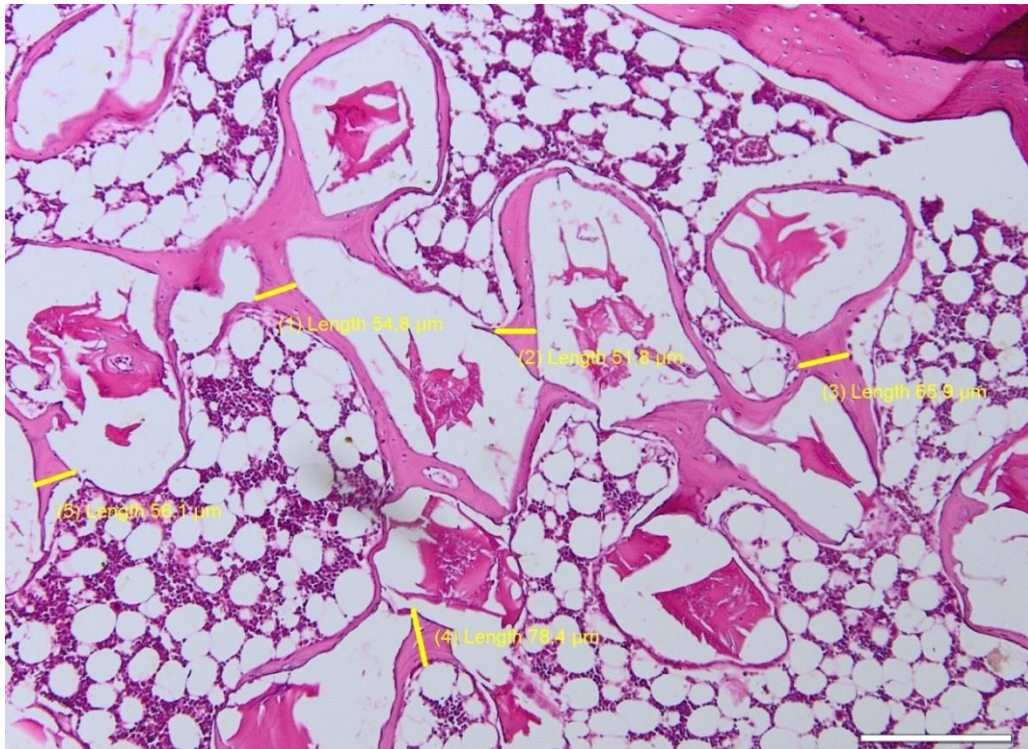


Fig. 4.33. HE;20X(TCP). Detaliu de la nivelul spațiului medular, cu os lamelar, țesut fibros și material exogen.

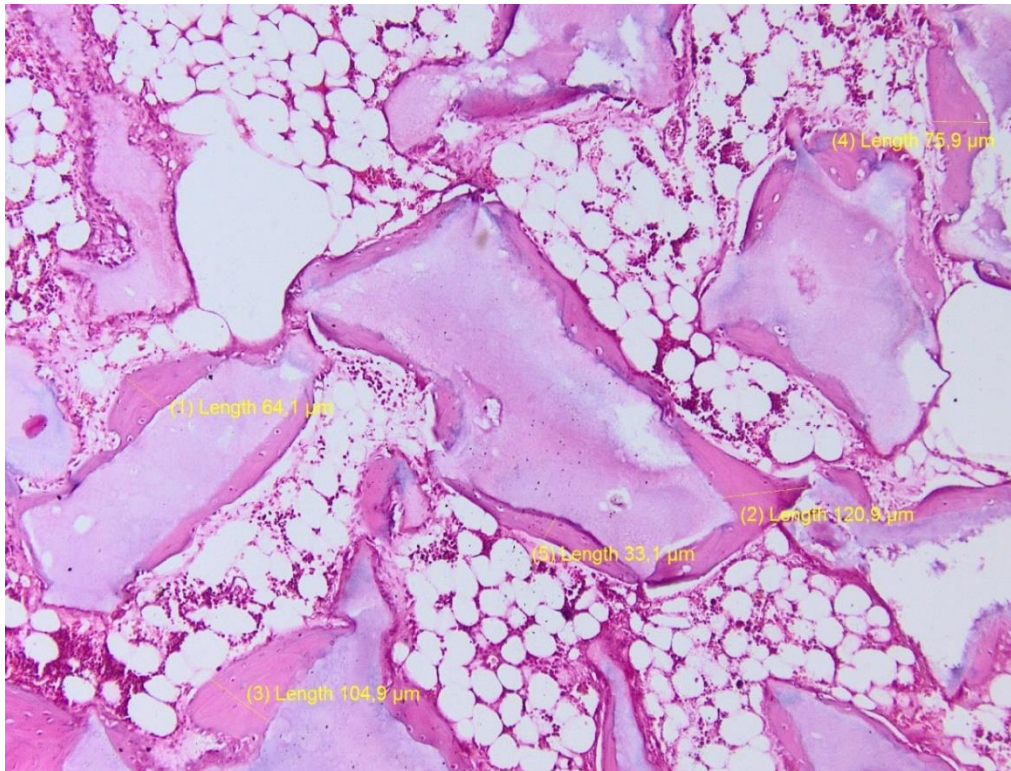


Fig. 4.34. HE;40X(TCP). Detaliu de la nivelul spațiului medular, cu punți de os lamelar, țesut fibros și material exogen prezent în totalitate, fără resorbția

Studiu asupra expresiei moleculei de adeziune a celulelor endoteliale plate (PECAM-1/CD31) ca marker angiogenetic în augmentarea osoasă a celor trei tipuri diferite de biomateriale

Obiectivele studiului

Scopul acestui studiu a fost de a analiza pe model animal capacitatea de integrare a substituenților osoși prin evaluarea angiogenezei, așa cum a fost demonstrată prin evaluarea expresiei imunohistochemice a moleculelor de adeziune a celulelor endoteliale plate (PECAM-1/CD31) în vecinătatea grefelor osoase, pentru trei biomateriale utilizate în general pentru augmentarea osoasă: hidroxiapatita bovină, fosfatul beta-tricalcic, sticlele bioactive, permițând revascularizarea țesuturilor și apariția ulterioară a lamelelor osoase. Proteinele evaluate sunt markeri ai endoteliului vaselor de sânge nou formate în apropierea biomaterialelor utilizate.

Într-un defect osos, angiogeneza este un proces obligatoriu pentru a obține osteogenează [8; 9;10].

Deși a fost inițial recunoscută ca o proteină capabilă de a realiza legături cu ea însăși și cu alte molecule non-PECAM-1 [11], există acum un număr semnificativ de dovezi că molecula (PECAM-1) a fost implicată în migrarea celulelor endoteliale, demonstrându-se că anticorpii anti-PECAM-1 inhibă angiogeneza in vivo.

CD31 este utilizat în principal pentru a demonstra prezența celulelor endoteliale în secțiunile histologice de țesut. [12;13]

Material si metoda

S-au efectuat teste imunohistochimice (IHC) pentru PECAM-1/CD31 iepuri). Reacțiile Ag-Ac sunt evidențiate printr-o reacție de culoare, obținută în urmă acțiunii unei anumite enzime (marcator enzimatic) asupra unui substrat specific care, prin descompunere, dă un produs colorat mai mult sau mai puțin stabil. Antigenele, localizate membranar, citoplasmatic sau nuclear, pot fi detectate cu ajutorul unor anticorpi specifici sau cu ajutorul unor seruri policlonale.

S-a evaluat numărul de vase și lumenul lor în jurul particulelor osoase de novo. În secțiunile marcate cu anticorp anti-CD31, numărul de vase și diametrul lumenului au fost comparativ analizate prin analiză vizuală. Datele au fost descrise prin comparație între cele trei materiale utilizate: hidroxiapatită bovină (BioOss), fosfat beta-tricalcic (Cerasorb) și sticle bioactive (Perioglass).

Colorațiile IHC au fost efectuate atât manual, cât și cu ajutorul imunocoloratorului automat, conform rețetelor pentru colorațiile IHC.

Ca protocol imunohistochimic, a fost respectat Protocolul de tehnici de lucru pentru prelucrare și colorare a preparatelor citopatologice și histopatologice pentru specialitatea anatomie patologică

.3. Rezultate

În acest studiu s-a utilizat softul statistic SPSS 22.

În cadrul analizei datelor, în urma analizei cantitative descriptive a distribuției celulelor CD31 pozitive în jurul materialului de augmentare, s-a observat că menținem o medie crescută a numărului de vase din lotul hidroxiapatitei bovine (BioOss) $6,58 \pm 0,59$ (Fig. 5.6.;5.7.) și al

fosfatului beta-tricalcic (Cerasorb) 4,47 +/- 0. (Fig. 5.8.;5.9.), comparativ cu lotul în care s-a utilizat sticla bioactivă (Perioglass) 1,58 +/- 0,246 (Fig. 5.10.;5.11.) (Tabelul 5.I.).

Testele Kurtosis și Skewness relevă o distribuție asimetrică la dreapta, în cazul primului lot, și distribuție la stânga pentru celelalte două loturi, cu aspect platirctic al curbei.

Folosind testul Kruskal-Wallis, media rankurilor în primul lot a fost de 43,7 urmat de 32,9 grupări fosfat triciclice și numai 10,32 pentru lotul de sticlă bioactivă.

Din analiza statistică am obținut o diferență semnificativă între cele trei grupuri, Chi pătrat = 40,0 la 2 grade libertate cu $p < 0,001$. (Tabelul 5.II.).

Pentru analiza comparativă pe fiecare pereche, s-a aplicat testul Mann-Witney, în prima fază pe toate loturile, apoi pe câte două, pentru a vedea unde este diferență semnificativă. Realizând analiza pe perechi, se pot observa diferențe semnificative statistic pentru toate cele trei perechi.

Aplicând testul Mann-Whitney, a fost obținut un val $U = 79$ ($N_1 = 19$, $N_2 = 19$) la un nivel de semnificație $p = 0,002 < 0,05$ (Tabelele 5.III.;5.IV.).

Aplicând testele de normalitate Kolmogorov-Smirnov și Shapiro-Wilk, ce au rolul de a verifica dacă un set de date este încadrat într-o distribuție normală, s-a observat că cele trei loturi nu respectă normalitatea.

Din analiza de mai sus, se observă diferențe semnificative statistic pentru toate cele trei perechi. Aceasta completează descoperirile în care cantitatea de os care se formează în jurul fosfatului beta-tricalcic și a hidroxiapatitei bovine este în mod clar superioară sticlei bioactive. Atât diametrul lumenului, cât și numărul de vase au fost ușor crescute pe lamele studiate în favoarea fosfatului beta-tricalcic (Cerasorb)

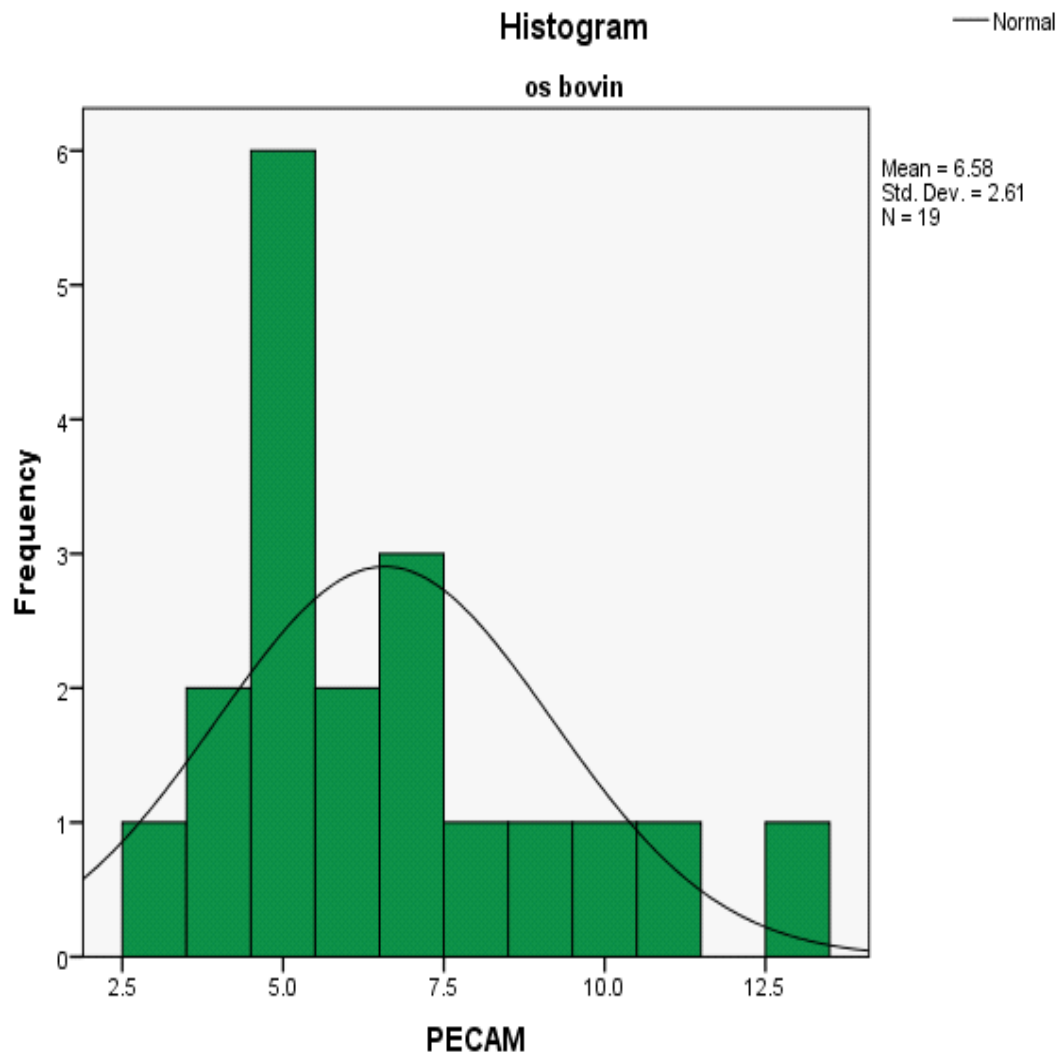


Fig. 5.6. Histogramă prezentând deviația standard și media numărului de vase nou formate în jurul granulelor de hidroxiapatită bovină.

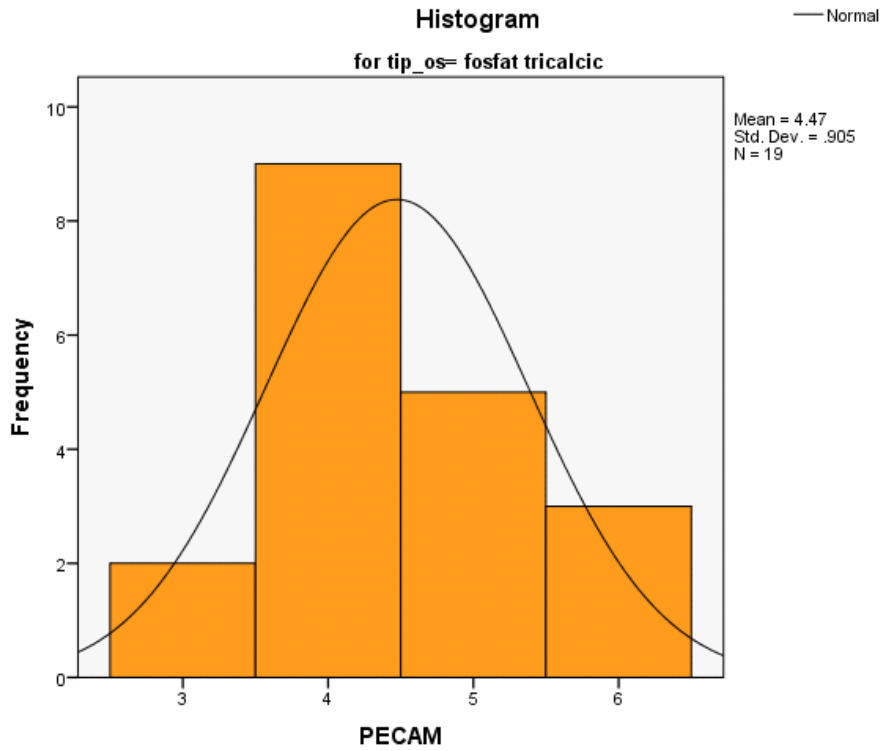


Fig. 5.7. Histogramă prezentând deviația standard și media numărului de vase nou formate în jurul granulelor de fosfat beta-tricalcic.

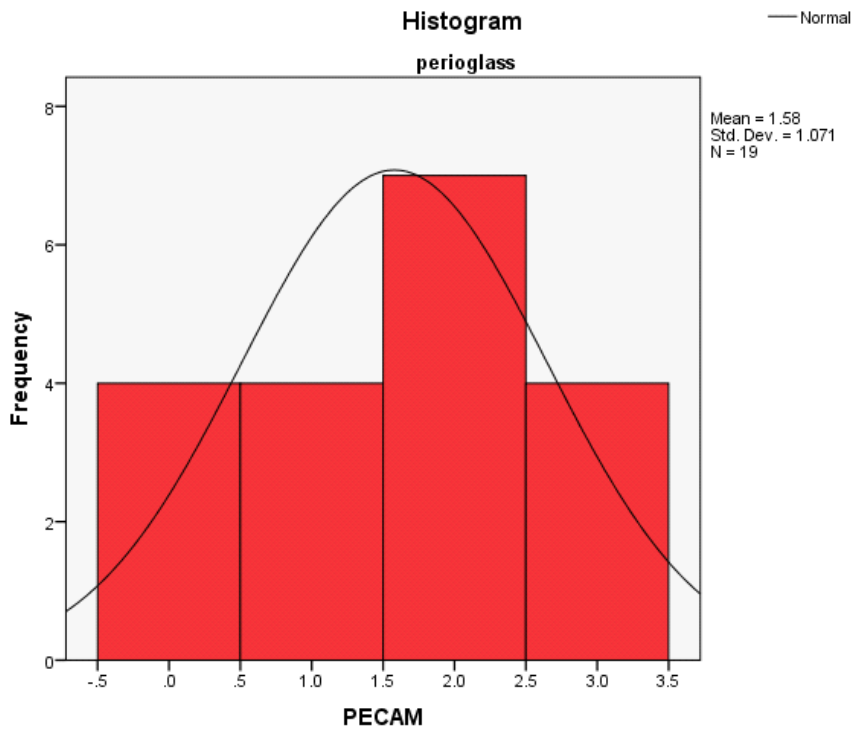


Fig. 5.8. Histogramă prezentând deviația standard și media numărului de vase nou formate în jurul granulelor de biosticlă.

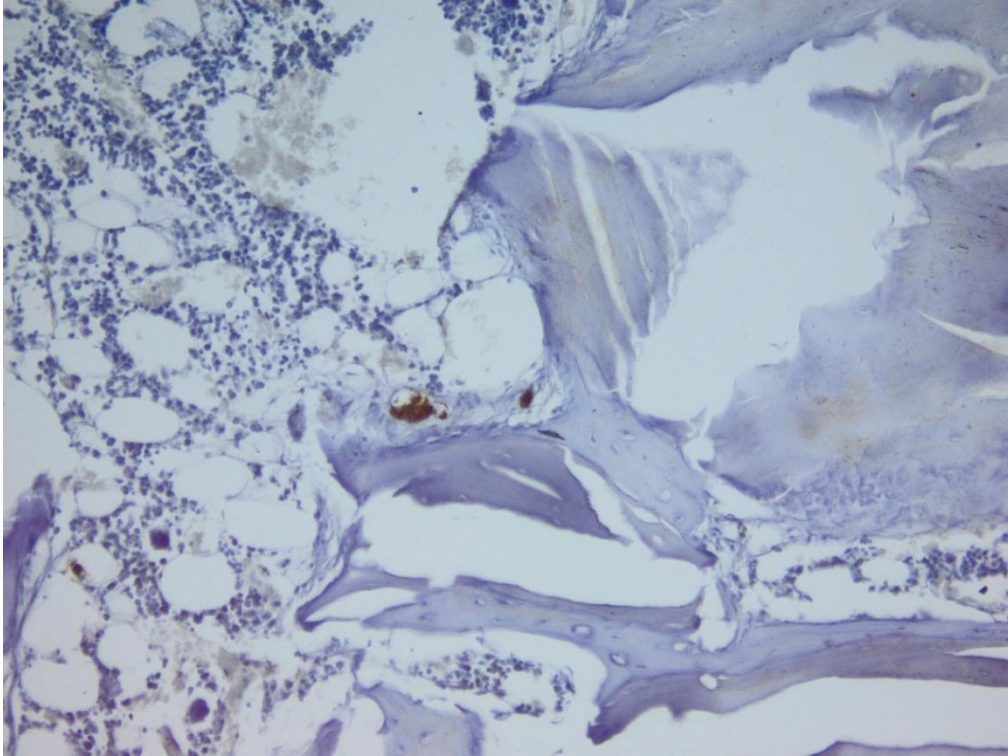


Fig. 5.13. 20X.[Hidroxiapatită bovină]. Endoteliu reactiv Pecam-1/CD31 prezent în jurul materialului, ce poate fi observat prin colorarea brun-întunecat a endoteliului vascular.

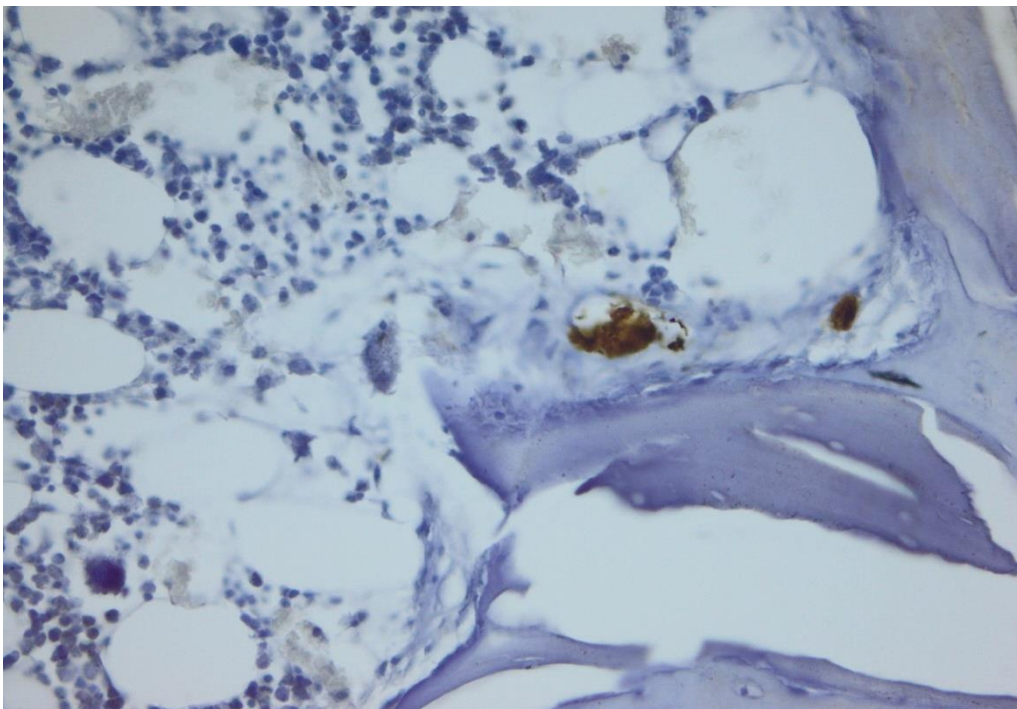


Fig.5.14. 40X.[Hidroxiapatită bovină]. Endoteliu reactiv Pecam-1/CD31 prezent în jurul materialului, ce poate fi observat prin colorarea brun-întunecat a endoteliului vascular.

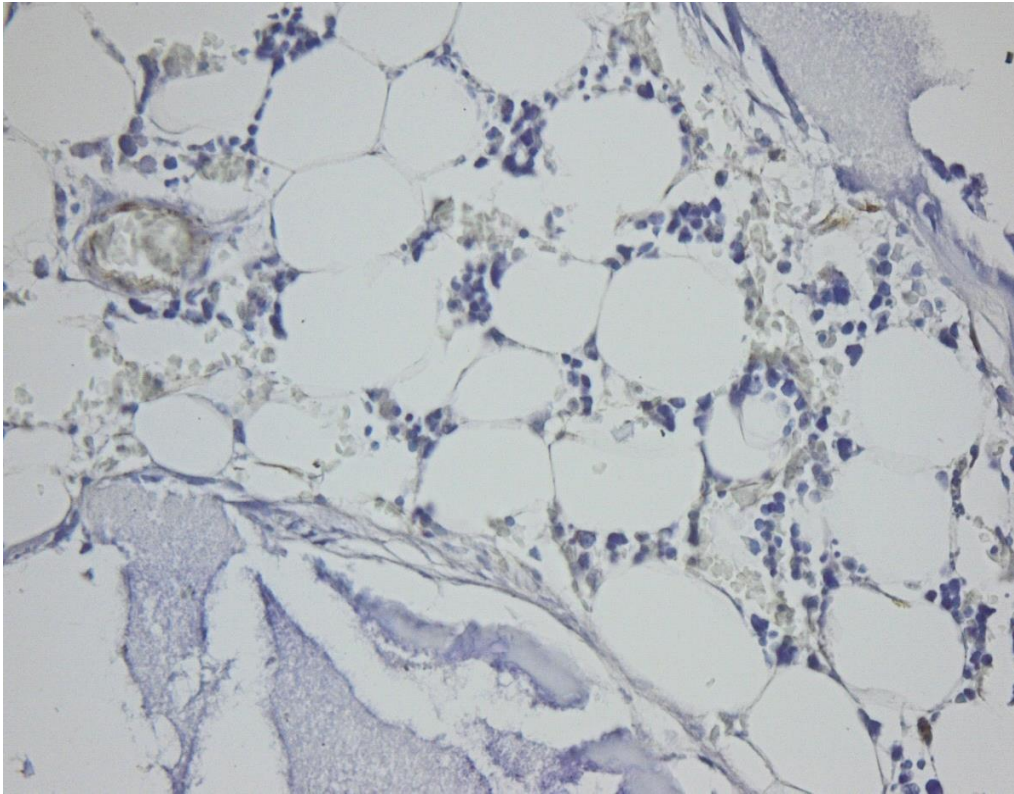


Fig. 5.21. 40X.[TCP]. Detaliu cu endoteliu reactiv Pecam-1/CD31 prezent în jurul materialului, ce poate fi observat prin colorarea brun-deschis a endoteliului vascular.

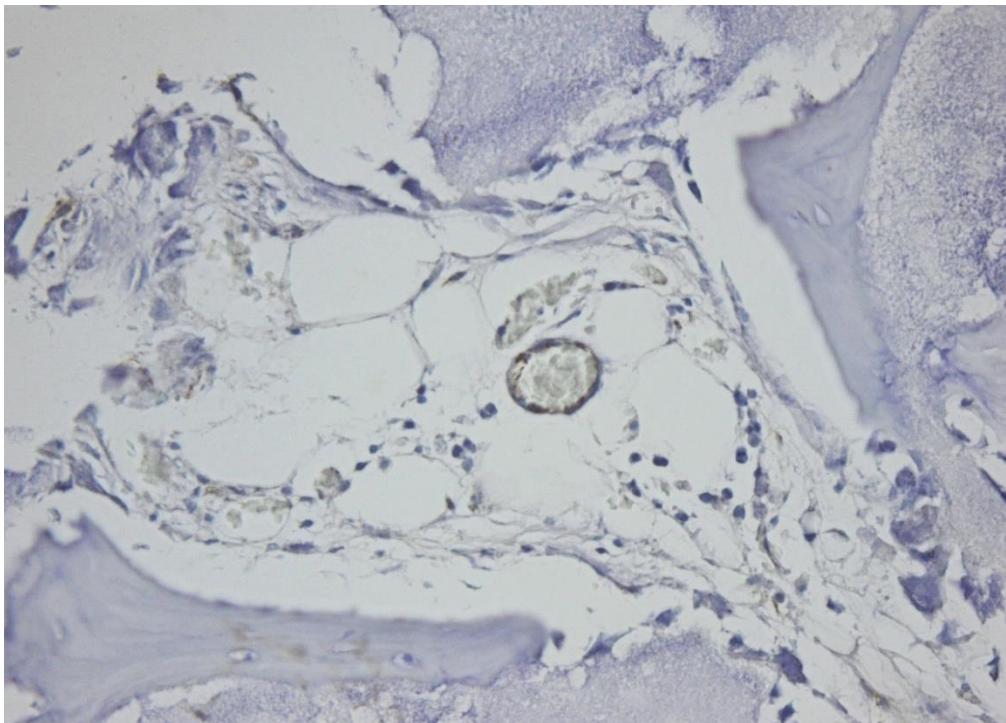


Fig. 5.22. 40X.[TCP]. Detaliu cu endoteliu reactiv Pecam-1/CD31 prezent înconjurat de granulele de fosfat beta-tricalic neresorbite și lamele de os nou format.

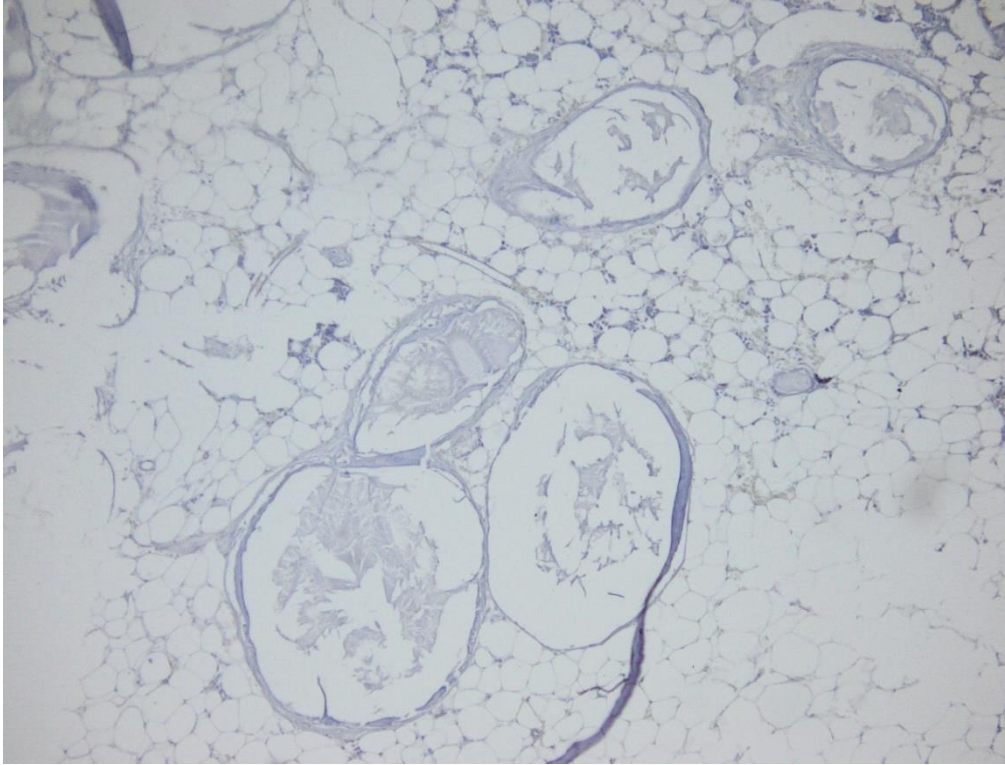


Fig. 5.31. 20X.[Biosticlă]. Perspectivă asupra unor granule de biosticlă (Perioglass) fără țesut osos nou format în jur și fără o prezență marcată a markerului angiogenic.

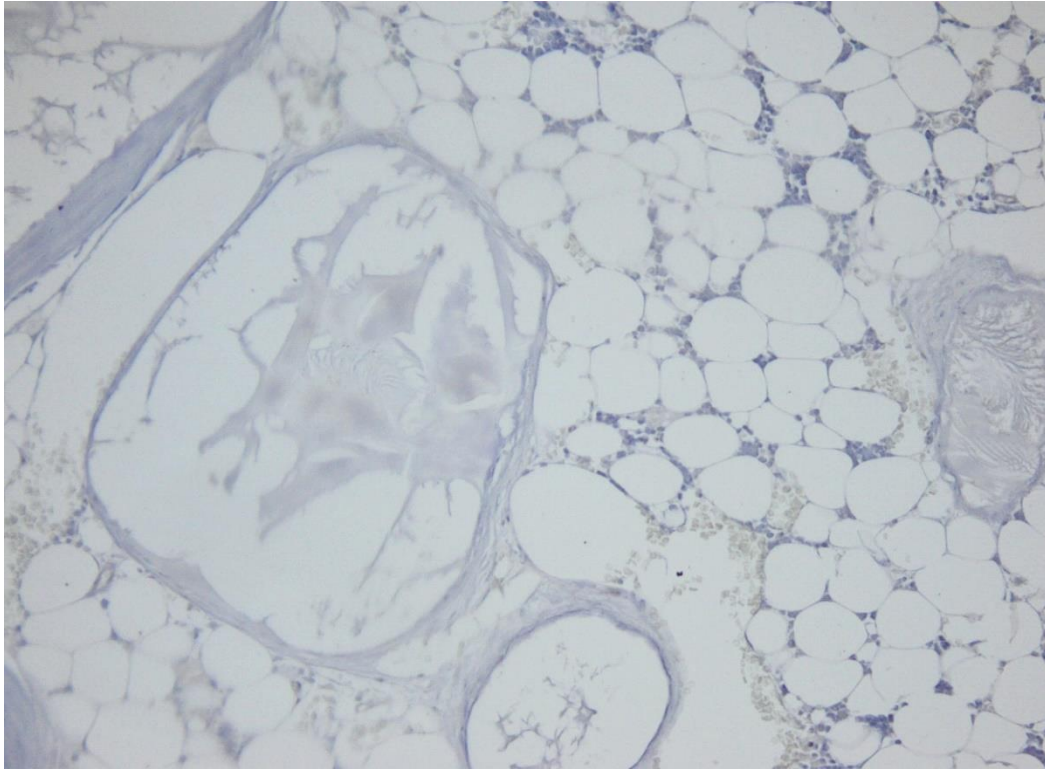


Fig. 5.32. 40X.[Biosticlă]. Detaliu asupra unor granule de biosticlă (Perioglass) cu medulară înconjurătoare și uşoare celule hipermarcate Pecam-1/CD31 prezente în jurul materialului

6. Studiul histopatologic asupra utilizării unor materiale de mărire a ofertei în asociere cu membrana de PTFE sau colagen în augmentarea osoasă

6.1. Obiectivele studiului

Scopul acestui studiu a fost de a analiza prin analiză descriptivă și histomorfometrie, folosind un model experimental animal, capacitatea de integrare a substituenților osoși a trei tipuri de materiale de augmentare, în asociere cu membrane resorbabile și neresorbabile, în augmentarea osoasă. Ca materiale de augmentare osoasă, s-au utilizat hidroxiapatita bovină (BioOss), fosfatul beta-tricalcic (Cerasorb) și sticlele bioactive (Perioglass). Membranele utilizate au fost reprezentate de membrane resorbabile de colagen și membrane neresorbabile din politetrafluoroetilenă (PTFE).

6.2. Material și metodă

Modul de lucru a fost același cu cel descris în primul studiu, iar, pe lângă componentă chirurgicală a acestui studiu, el a prezentat și o componentă histologică, descrisă, de asemenea, în studiile anterioare, ce a inclus histotehnica osului, prin tehnicile de fixare, decalcificare, includere, secționare și, în final, colorarea lamelor histopatologice cu colorația hematoxilina-eozină

Geodele osoase intracorticale au fost realizate cu ajutorul unei freze, având 4 mm diametru intern și 2 mm în diametru extern, pe fiecare tibie, creând astfel o geodă osoasă în zona centrală a tibiei. Un număr de 4 defecte au fost augmentate cu hidroxiapatită bovină (BioOss), alte 4 defecte au fost augmentate cu fosfat beta-tricalcic (TCP) și alte 4 cu biosticlă (Bioglass). Dintre acestea, câte două din fiecare material au fost acoperite cu membrane de colagen, în timp ce câte două din fiecare material au fost acoperite cu o membrană neresorbabilă pe bază de PTFE. Acoperirea membranelor a fost realizată pentru a obține o barieră față de țesutul conjunctiv. După aplicarea membranelor, s-a realizat o sutură a plăgilor în trei planuri (periost, țesut muscular și tegument). Postoperator li s-a administrat animalelor ketoprofen, timp de trei zile

6.3. Rezultate

Cei 12 iepuri au fost împărțiți în trei grupuri: grupul A, unde s-a folosit hidroxiapatită bovină (BioOss), grupul B, în care s-a folosit fosfat beta-tricalcic (Cerasorb), și grupul C, unde s-a folosit sticlă bioactivă (Perioglass). Un număr de 4 defecte au fost augmentate cu hidroxiapatită bovină (BioOss), alte 4 defecte au fost augmentate cu fosfat beta-tricalcic

(Cerasorb) și alte 4 cu biosticlă (Perioglass). Dintre acestea, câte două din fiecare material au fost acoperite cu membrane de colagen, în timp ce câte două din fiecare material au fost acoperite cu o membrană neresorbabilă pe bază de PTFE, rezultând astfel 6 defecte acoperite cu membrană de PTFE și 6 membrane acoperite cu membrane de colagen.

Din punct de vedere histomorfometric, în urma analizei statistice descriptive a cantității de țesut osos matur format în jurul materialului de augmentare, s-a observat că grosimea lamelor de os nou format în jurul particulelor de material folosit la augmentare a avut o medie de 98,26 μm în cazul membranei de colagen, urmată de o valoare net inferioară de 49,19 μm în cazul membranei de PTFE.

Având în vedere că mai există o variabilă, dată de tipul de materiale, am obținut o grosime a lamelor osoase pentru materialul reprezentat de hidroxiapatită bovină (BioOss) acoperit cu membrană de colagen cu o medie de 90,4056 μm , reprezentând grosimea lamelor de os nou format în jurul particulelor. Hidroxiapatita bovină (BioOss) acoperită cu membrană de PTFE a avut o grosime medie de 80,36 μm . Fosfatul beta-tricalcic (Cerasorb) acoperit cu membrană de colagen prezintă o medie a grosimii lamelor osoase nou formate de 73,67 μm , în timp ce fosfatul beta-tricalcic (Cerasorb) acoperit cu membrană de PTFE a prezentat o medie a lamelor osoase de 69,52 μm . În cazul sticlei bioactive (Perioglass), cantitatea de os nou format a fost semnificativ redusă, cu o medie de 31,88 μm , atunci când a fost acoperită cu membrană de colagen, și de 20,10 μm , când acest material a fost acoperit cu membrană de PTFE.

Diferența, după cum se poate observa, este semnificativ redusă în cazul membranei neresorbabile. Acest efect se produce mai ales datorită apariției unor dehiscente punctiforme, acest lucru putând fi observat și în cazul câtorva exemplare din grupul studiat B. Aceste dehiscente au permis infiltrarea țesutului fibros la nivelul geodei augmentate.

Studiul nostru completează descoperirile în care cantitatea de os care se formează în jurul fosfatului beta-tricalcic și a hidroxiapatitei bovine este evident superioară sticlelor bioactive.

Tabelul 6.I.

Media grosimii lamelor osoase în funcție de tipul de os

Media grosimii lamelor osoase în funcție de tipul de os			
	Tip_os	Colagen	PTFE
Grosime	HA	90,40	80,36
	BTCP	73,67	69,52
	Sticlă bioactivă	31,88	20,10

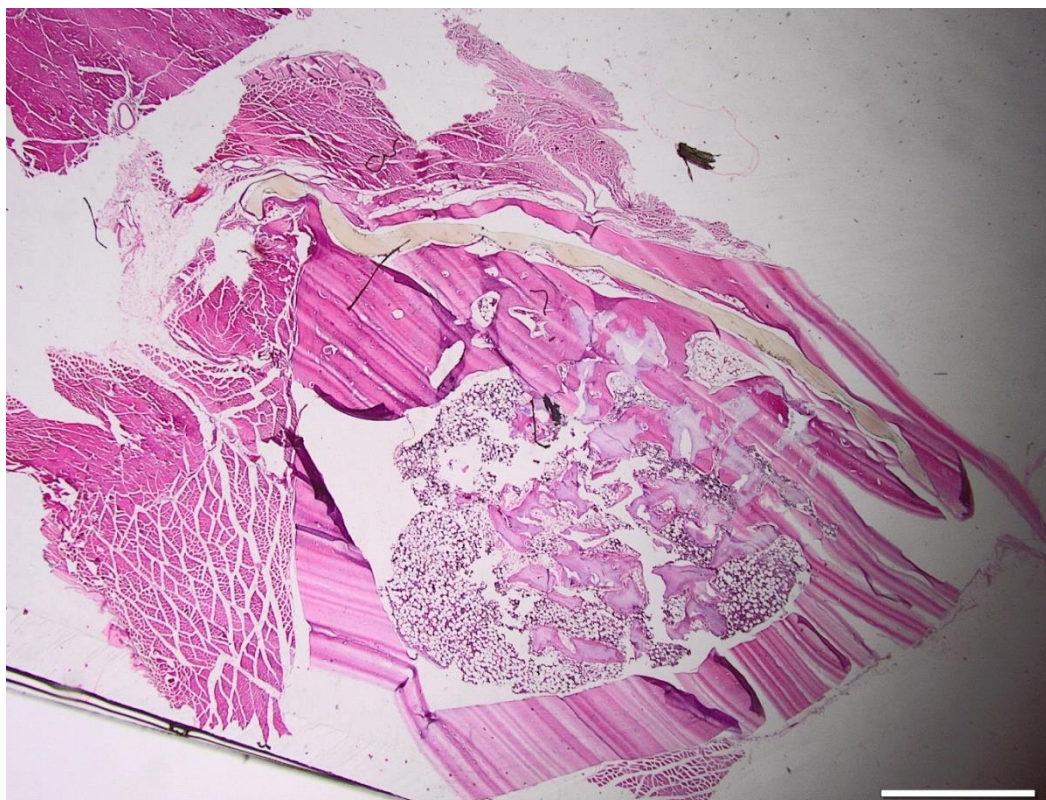


Fig. 6.1. 20X.[TCP]. Imagine de ansamblu cu materialul augmentat și lamele de țesut osos nou format, împreună cu membrana de PTFE ce a rămas pe loc deasupra corticalei.

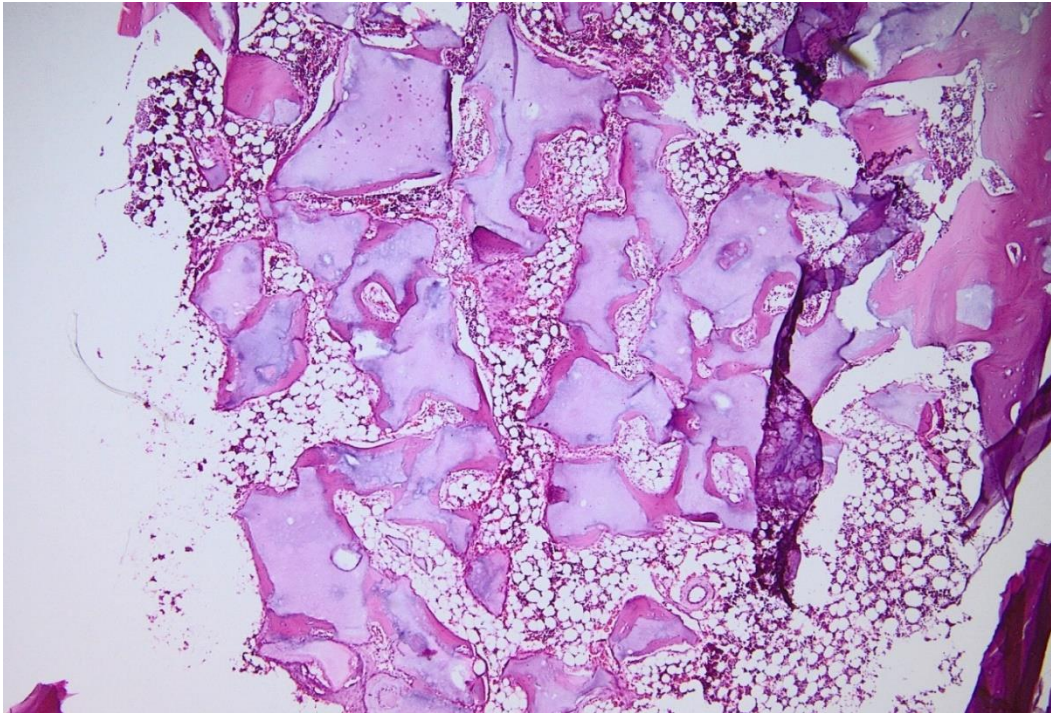


Fig.6.2. 20X.[TCP]. Imagine de ansamblu cu materialul de augmentare și lamele de țesut osos nou format în jurul corticalei, protejate de membrana neresorbabilă de PTFE.

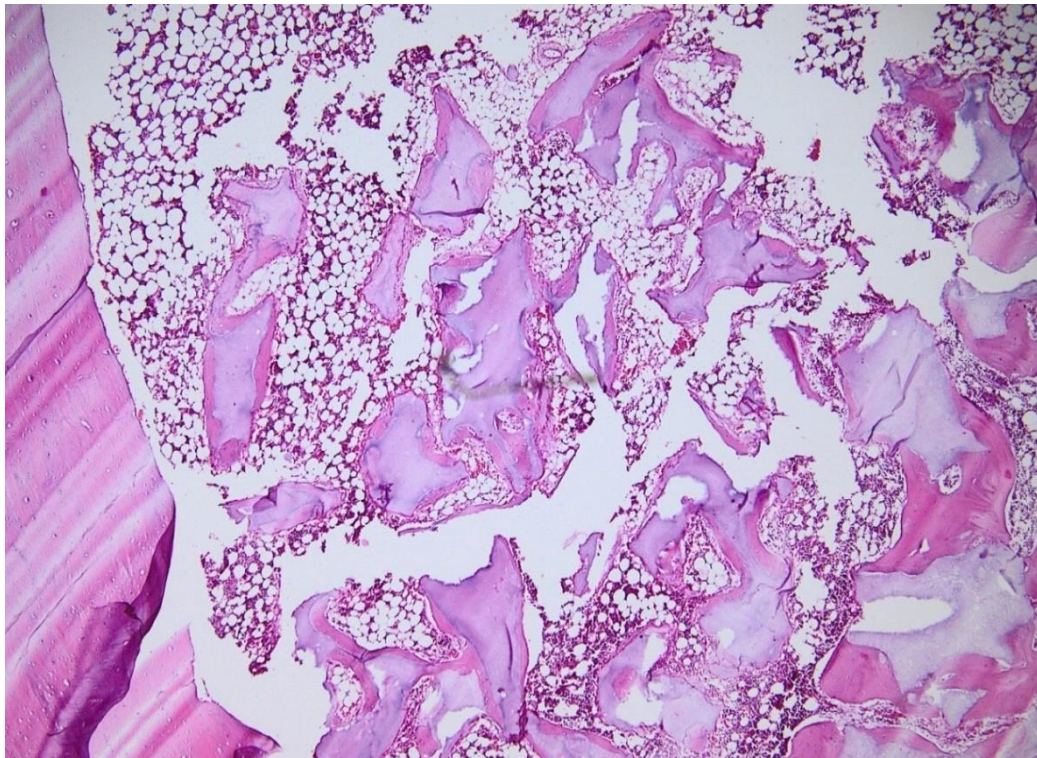


Fig. 6.4. 20X.[TCP]. Detaliu asupra materialului de augmentare protejat cu membrană de PTFE și dimesniunea lamelilor osoase astfel obținute.

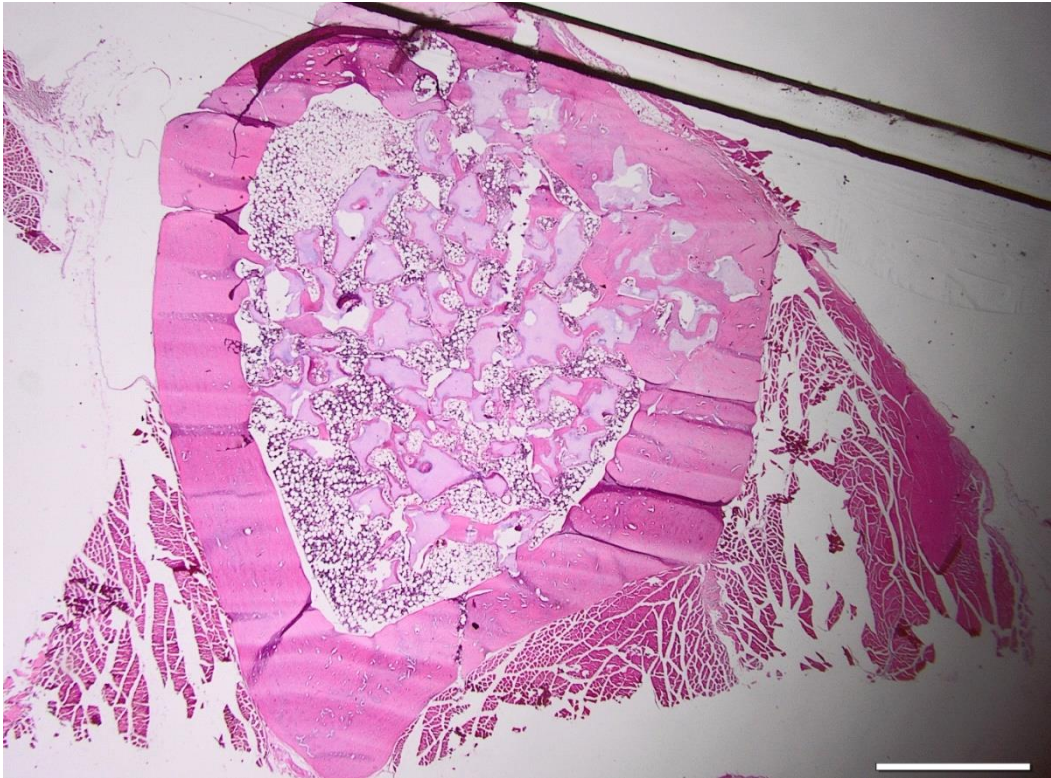


Fig.6.5. 20X.[TCP]. Imagine de ansamblu asupra materialului de augmentare protejat cu membrană de collagen ce s-a absorbit.

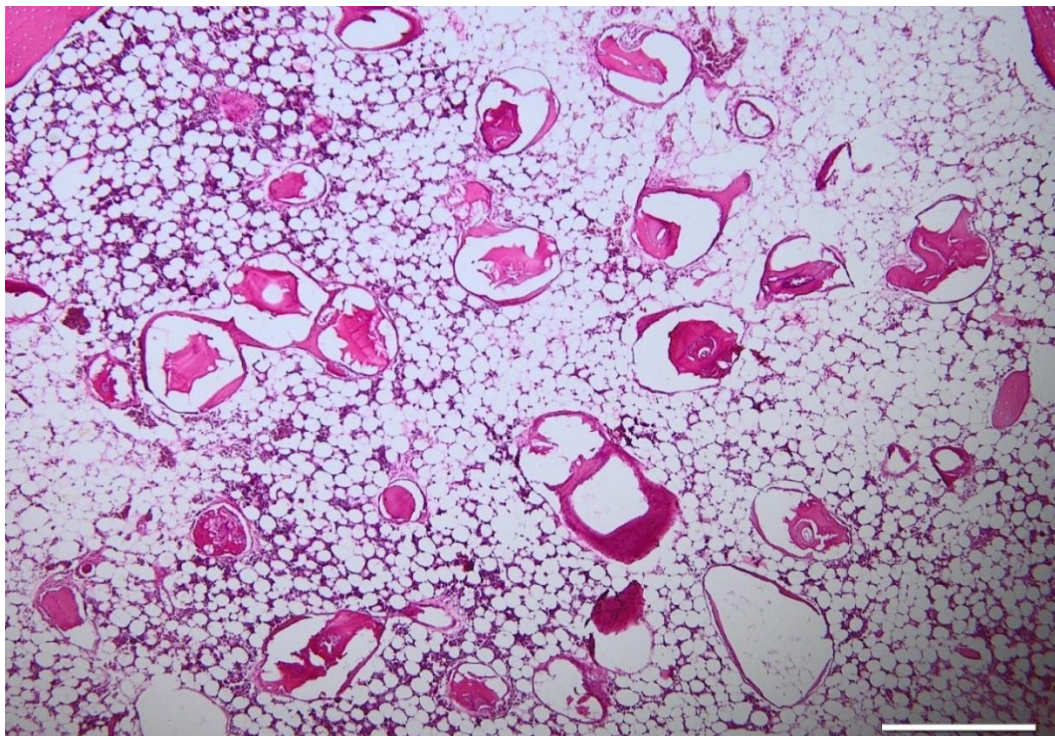


Fig. 6.15. 20X.[Biosticlă]. Imagine de ansamblu asupra materialului de augmentare protejat cu membrană de collagen și cu dimensiunea lamelelor de os nou format.

8. CONCLUZII

1. Cele trei materiale, reprezentate de hidroxiapatita bovină (BioOss); fosfatul beta-tricalic (Cerasorb) și sticla bioactivă (Perioglass), acționează ca o matrice osteoconductoare, însă nu au capacitate osteoinductivă de formare osoasă de novo.

2. Reducerea în dimensiuni a materialelor de augmentare osoasă, hidroxiapatita bovină (BioOss), fosfatul beta-tricalic (Cerasorb) și sticla bioactivă (Perioglass), a produs în perioada studiată o serie de spații libere între osul nou format și acestea, scăzând rezistența osoasă.

3. Cantitatea de os nou format a fost ușor mărită în cazul hidroxiapatitei bovine (BioOss), față de fosfatul beta-tricalic (Cerasorb), sugerând că ele nu interferă într-un mod major la regenerarea osoasă.

4. Dintre toate cele trei materiale studiate, sticla bioactivă (Perioglass) a avut cele mai slabe rezultate, atât din punct de vedere al formării osoase, cât și din punct de vedere al neoangiogenezei capilare.

5. În cazul tuturor celor trei materiale de augmentare, putem afirma că angiogeneza și osteogeneza sunt corelate în mod intim prin faptul că există o tendință spre o activitate mai bună a hidroxiapatitei bovine (BioOss) și a fosfatului beta-tricalic (Cerasorb), comparativ cu sticla bioactivă (Perioglass).

6. Strategia pentru o creștere optimă a osului și înlocuirea matricei constă în echilibrul între rata de reabsorbție a materialului și cantitatea de os nou format.

7. Niciunul dintre materiale nu s-a resorbit pe perioada studiată de 6 luni, deși turnoverul osos la modelul animal utilizat față de om este de trei ori mai rapid.

8. În cazul utilizării a două tipuri de membrane, am observat că, indiferent de materialul de augmentare folosit, în cazul acoperirii cu membrană resorbabilă de colagen,

cantitatea de os nou format în jurul materialului de augmentare a fost sensibil crescută în comparație cu membrana neresorbabilă PTFE.

9. Cel mai slab rezultat, în sensul formării de lamele mature de os nou format, a fost în cazul utilizării biosticlei (Perioglass) în combinație cu membrana neresorbabilă de PTFE.

10. Indiferent de materialul de augmentare utilizat, autogrefele, prin capacitatea lor atât osteoconductivă, cât și osteoinductivă, rămân standardul de aur în augmentarea

Bibliografie Selectiva

1. Neyt JG, Buckwalter JA, Carroll NC. Use of animal models in musculoskeletal research. *Iowa Orthop J* 1998;18:118–123.
2. Gilsanz V, Roe TF, Gibbens DT, Schulz EE, Carlson ME, Gonzalez O, Boechat MI. Effect of sex steroids on peak bone density of growing rabbits. *Am J Physiol* 1988;255:E416–E421.
3. Rispoli et al. Surgery Guidelines for Barrier Membranes in Guided Bone Regeneration (GBR). *J Otolaryngol Rhinol* 2015;1:2. ISSN: 2379-948X.
4. Elder BD, Eleswarapu SV, Athanasiou KA. Extraction techniques for the decellularization of tissue engineered articular cartilage constructs. *Biomaterials* 2009;30:3749–3756.
5. Vavken P, Joshi S, Murray MM. Triton-X is most effective among three decellularization agents for ACL tissue engineering. *J Orthop Res* 2009;27:1612–1618.
6. Price CT, Connolly JF, Carantzas AC, Ilyas I. Comparison of bone grafts for posterior spinal fusion in adolescent idiopathic scoliosis. *Spine (Phila Pa 1976)* 2003;28:793–798.
7. Sprio S, Fricia M, Maddalena GF, Nataloni A, Tampieri A. Osteointegration in cranial bone reconstruction: a goal to achieve. *Appl Biomater Funct Mater* 2016 Nov 2;14(4):e470–e476. doi:10.5301/jabfm.500029
8. Geris L, Gerisch A, Sloten JV, Weiner R, Oosterwyck HV. Angiogenesis in bone fracture healing: a bioregulatory model. *J Theor Biol* 2008;251(1):137–158.
9. Chang HN, Garetto LP, Potter RH, Katona TR, Lee CH, Roberts WE. Angiogenesis and osteogenesis in an orthopedically expanded suture. *Am J Orthod Dentofac Orthop* 1997;111(4): 382–390.
10. Geiger F, Bertram H, Berger I, et al. Vascular endothelial growth factor gene-activated matrix (VEGF165-GAM) enhances osteogenesis and angiogenesis in large segmental bone defects. *J Bone Miner Res* 2005;20(11):2028–2035.
11. Albelda SM1, Muller WA, Buck CA, Newman PJ. Molecular and cellular properties of PECAM-1 (endoCAM/CD31): a novel vascular cell-cell adhesion molecule. *J Cell Biol* 1991;114(5):1059–1068.
12. Raftery R, Mencia I, Chen G, et al. Translating the role of osteogenic-angiogenic coupling in bone formation: highly efficient chitosan-pDNA activated scaffolds can accelerate bone regeneration in critical-sized bone defects. *Biomaterials* 2017;149:116–127.
13. Uchida S, Sakai A, Kudo H, et al. Vascular endothelial growth factor is expressed along with its receptors during the healing process of bone and bone marrow after drill-hole injury in rats. *Bone* 2003;32(5):491–501.

