

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE

"CAROL DAVILA"

FACULTATEA DE MEDICINĂ DENTARĂ

ȘCOALA DOCTORALĂ

Teză de Doctorat

Rezumat

**EVALUAREA MATERIALELOR ALOPLASTICE DE
ADITIE OSOASĂ VERSUS OS AUTOGEN ȘI PRF**

Coordonator științific:

Prof. Univ. Dr. Pătrașcu Ion

Doctorand:

Dr. Călin Claudiu

București

2017

Cuprins

Introducere.....	3
Partea Generală	
Capitolul I	
<i>Ortofosfații și fosfatul tricalcic.....</i>	<i>4</i>
<i>Beta-fosfatul tricalcic.....</i>	<i>4</i>
Capitolul al II-lea	
<i>Concentrate plachetare.....</i>	<i>8</i>
<i>Fibrină bogată în trombocite și în leucocite (L-PRF).....</i>	<i>9</i>
Partea Personală	
Capitolul al III-lea	
<i>Analiză histomorfometrică a defectelor osoase postextracționale tratate cu beta-fosfat tricalcic (β-TCP) și fibrină bogată în trombocite (PRF).....</i>	<i>12</i>
<i>Scopul studiului.....</i>	<i>12</i>
<i>Material și metodă.....</i>	<i>12</i>
<i>Rezultate.....</i>	<i>14</i>
<i>Discuții.....</i>	<i>17</i>
<i>Concluzii.....</i>	<i>17</i>
Capitolul al IV-lea	
<i>Analiză micro-CT a alveolelor postextracționale tratate cu beta-fosfat tricalcic (β-TCP) și fibrină bogată în trombocite (PRF).....</i>	<i>18</i>
<i>Scopul studiului.....</i>	<i>18</i>
<i>Material și metodă.....</i>	<i>18</i>
<i>Rezultate.....</i>	<i>19</i>
<i>Discuții.....</i>	<i>21</i>
<i>Concluzii.....</i>	<i>22</i>
Concluzii generale.....	24
Bibliografie.....	25

Introducere

Biomaterialele de adiție utilizate în practica curentă sunt reprezentate de autogrefe, alogrefe, xenogrefe și materiale sintetice.

Întrucât primele trei clase de grefe osoase sunt limitate ca utilizare din cauza multiplelor dezavantaje ce vor fi detaliate în cele ce urmează, alegerea prezentei teze de doctorat se bazează pe utilizarea unui reprezentant al clasei de biomateriale aloplastice (β -TCP, beta-fosfatul tricalcic) în combinație cu o substanță autologă (PRF, fibrina bogată în plachete).

Motivul alegerii acestei combinații pentru evaluare, a fost legată în primul rând de rezultatele uneori contradictorii și heterogene în folosirea acestui amestec. Mai mult decât atât consider că utilizarea unui biomaterial sintetic împreună cu un material autolog care nu produce niciun defect (putând fi recoltat fără repercusiuni și complicații) ar trebui să reprezinte obiectivul primar în procedurile de regenerare osoasă. Momentan utilizarea factorilor de creștere recombinanți în tratamentul defectelor osoase este încă la început de drum, chiar dacă în ultima vreme au apărut rezultate foarte bune în tratamentul diferitelor tipuri de defecte. Suplimentar, prețul de cost al acestui tip de tratament este încă prohibitiv pentru numeroși pacienți, iar alternativa de a îmbunătăți zona viitoare intervenții cu factori de creștere derivați din propriul ser al pacientului și a beneficia de capacitatea regenerativă proprie la un preț scăzut ar trebui să constituie un standard.

Având în vedere cele expuse anterior, în acest rezumat voi încerca să cuprind punctele cheie, păstrând structura generală a tezei și axându-mă doar pe exponentul principal al fiecărui capitol în parte. Astfel, în partea generală a rezumatului am caracterizat și descris principalele modalități de obținere ale beta-fosfatului tricalcic și ale PRF; suplimentar, caracteristicile ambelor biomateriale utilizate în studiu vor fi coroborate cu aspecte succinte legate de comportamentul lor biologic.

În partea personală am analizat influența combinației β -TCP - PRF folosite în defecte osoase postextracționale la nivelul maxilarului de iepure prin intermediul analizelor histologică, histomorfometrică și de micro-computer-tomograf (micro-CT).

În încheierea acestui rezumat al tezei am inclus concluziile generale și referințele bibliografice.

Partea generală

Capitolul I

Ortofosfații și fosfatul tricalcic

Fosfatul tricalcic reprezintă un biomaterial sintetic, obținut prin procesare artificială în urma tratării hidroxiapatitei cu acid fosforic și hidroxid de calciu, făcând parte din familia *ortofosfaților de calciu*.

Uniunea Internațională de chimie pură și aplicată (IUPAC) denumește fosfatul tricalcic bis-orto-fosfat tricalcic, di-orto-fosfat tricalcic sau fosfat de calciu tribazic; de asemenea acest compus se mai regăsește în literatură sub formă de fosfat de calciu precipitat.

Acest biomaterial posedă o stoechiometrie asemănătoare cu faza amorfă precursoră de țesut osos biomineralizat, în care celulele responsabile de osteogeneză și apozitie osoasă (osteoblastele) se acumulează anarhic în vezicule intracelulare specializate de fosfat de calciu amorf¹.

Fosfatul tricalcic pur nu poate fi găsit în surse naturale și nu poate fi obținut artificial din suspensii cu conținut de apă, deoarece temperaturile sale de sinteză depășesc temperatura de evaporare a apei.

Fosfatul tricalcic este obținut sub următoarele forme cristaline: α , α' , β și γ . În acest rezumat vor fi tratate doar aspectele legate de utilizarea fosfatului tricalcic în varianta polimorfă beta.

Beta-Fosfat Tricalcic (β -TCP)

β -TCP poate rezulta în urma dezintegrării termice a CDHA (peste 800° C și mai puțin de 1200° C). Noi tehnici de producere a β -TCP la temperaturi înalte sunt reprezentate de metoda precipitării umede (chimice), metoda sol-gel (folosind precursori organici și anorganici) și metoda sintezei prin combustie². De asemenea compusul mai poate fi obținut și la temperaturi mult mai joase situate între 900 C și 1700 C prin precipitarea în etilen glicol³.

Probabil cea mai naturală formă de ortofosfat și în strânsă legătură cu procesele metabolice din țesuturile vii este reprezentată de beta-fosfatul tricalcic de magneziu (β -TCMP) în care calciul este înlocuit parțial. Având în vedere rata de disoluție mult mai redusă a β -TCMP

comparativ cu β -TCP, cel dintâi se va forma în locul celui din urmă dând naștere multor calcificări biologice precum: calculi ale glandelor salivare mari⁴, procese aterosclerotice vasculare⁵, cartilaj femural și țesut discal intervertebral⁶.

În urma imersiei într-un mediu apos, β -TCP înregistrează o scădere de aproximativ 1/2 a rezistenței mecanice, în primele 30 de zile ajungând la valori ale rezistenței la compresiune de 30 MPa⁷, similar cu osul spongios; acest fapt a fost pus pe seama solubilizării de suprafață a compusului; prin comparație, rezistența la compresiune a osului cortical este între 90 MPa și 200 MPa. În aceeași ordine de idei, rezistența la tensiune a β -TCP este asemănătoare cu cea a osului spongios⁸; prin comparație, rezistența la tensiune a osului cortical are valori similare cu cea de compresiune, fiind situată între 90 MPa și puțin sub valoarea de 200 MPa. Adicional, β -TCP este considerat a fi un material casant, având slabă rezistență la oboseală și forfecare⁹.

Apariția structurii poroase a biomaterialelor de adiție sporește și facilitează creșterea osoasă și consecutiv apariția de țesut osos de novo comparativ cu o structură netedă, prin invazia de celule generatoare de țesut osos în structura grefei, cât și prin vascularizația abundentă. Influența structurii poroase a scaffoldului asupra regenerării osoase este pusă pe seama porozității globale a biomaterialului, cât și pe diametrul porilor situați atât în profunzime cât și la suprafață. Pe de altă parte este considerat că o creștere a suprafeței și a dimensiunii rețelei de pori și spații goale din interiorul grefei, deși benefică pentru apozitia osoasă, ar periclita rezistența mecanică a biomaterialului. Așa cum am arătat mai sus, rezistența mecanică este compusă din multiple forțe care acționează asupra grefei propriu-zise. Este considerat că problematica afectării rezistenței grefei prin porozitate este valabilă doar în cazul defectelor osoase segmentale, unde continuitatea țesutului osos este absentă și trebuie restabilită; în cazul defectelor minore (post-extractionale, peri-implantare), unde există suficienți pereți (corticali) osoși care să stabilizeze tridimensional grea împotriva forțelor de dislocare, efectele porozității asupra rezistenței ar fi minime. Cu toate acestea, există studii pe animale de laborator cărora li s-au creat defecte osoase segmentale, sau asemănătoare cu cele segmentale, în care s-au implantat materiale aloplastice poroase cu rezultate pozitive. Astfel, în urma implantării în femurul de caine a unor cilindri de aluminat de Ca cu o porozitate globală prestabilită și pori interconectați sub formă de rețea ($\varnothing$ 45 μ m până la 200 μ m) rezultă o creștere mai abundentă a țesutului osos în cazul unei porozități de 65% și diametre ale porilor situate între 75 μ m și 100 μ m¹⁰. Similar, o mai mare creștere osoasă a fost observată consecutiv implantării unui polimer combinat cu β -TCP în calvaria de iepure, având porozitatea globală peste 80% și diametre ale porilor situate între 125 μ m și 150 μ m¹¹.

Deși inițial s-a considerat că diametrul optim al porilor care favorizează apozitia și

formarea de țesut osos de novo era de $100\ \mu\text{m}^{10}$, în zilele de astăzi asistăm la o schimbare a paradigmei odată cu apariția unor studii de referință. Astfel, este binecunoscut astăzi că diametrul porilor influențează tiparul de osificare și osteogeneza apărută în interiorul grefei; după implantarea subcutanată pe șobolani Wistar timp de 30 de zile a hidroxiapatitei sub formă de fagure combinată cu proteine de morfogeneză osoasă recombinată (rhBMP-2), este concluzionat că dimensiunea optimă a porilor care favorizează apozitia directă de țesut osos fără interpunerea unui țesut de tranziție este de $350\ \mu\text{m}^{12}$. Acest tip de osificare este caracteristic osificării de membrană, în care țesutul osos este depus direct (de către osteoblaste diferențiate) în interiorul țesutului conjunctiv primar din situsurile biomaterialului. Prin contrast, tot în studiul anterior-menționat, în porii cu diametre situate în jurul valorii de $100\ \mu\text{m}$, țesutul osos de novo apare consecutiv formării unui țesut cartilaginos de tranziție. Acest tipar de osteogeneză este reprezentativ osificării endocondrale, în care din țesutul conjunctiv primar dens se diferențiază condrocite responsabile de formarea țesutului cartilaginos hialin; consecutiv, acest țesut va fi transformat în țesut osos prin apariția unor centri de osificare produși de osteoblaste. Este foarte important de menționat că aceste rezultate ale studiului sunt reprezentative pentru HA în formă de fagure, alte biomateriale ca sticla fibroasă și diametre similare ca cele prezentate anterior ducând doar la apariția unui țesut cartilaginos, fără a evolua spre țesut osos. Pe de altă parte, o rețea internă cu diametre ale porilor foarte reduse fie pentru scaffold-ul din HA, sau sticla fibroasă nu este capabilă să susțină nici formarea de țesut osos și nici cea de țesut cartilaginos.

Este binecunoscut faptul că atât β -TCP cât și restul ortofosfaților sunt biomateriale osteoconductive, neavând capacitatea (utilizate singure) de a induce un stimul capabil să producă o cascadă de reacții biologice din care să rezulte geneza unor țesuturi specializate. Pe de altă parte, este considerat că structura arhitecturală tridimensională a grefei orto-fosfat poate capta din mediul circulant elemente responsabile de osteogeneză ca de exemplu BMP-urile, biomaterialul îndeplinindu-și rolul de scaffold și devenind astfel o entitate osteoinductivă¹³. Probabil din acest motiv într-un articol recent de tip revizuire sistematică a literaturii de specialitate în domeniul ortofosfaților, se face referire la β -TCP ca fiind atât un material osteoconductiv cât și osteoinductiv¹⁴.

Osteoconductivitatea β -TCP a fost demonstrată recent în urma cultivării de osteoblaste umane primordiale direct pe acesta, comparativ cu culturi tisulare din plastic¹⁵; astfel, β -TCP joacă rolul unui scaffold prin creșterea și activarea căii de semnalizare bazate pe integrina alfa2/beta 1 și a protein-kinazei activate-mitogen (MAPK)/kinazei extracelulare (ERK).

Pentru ca un material aloplastic în general și β -TCP în special să fie considerate

biomateriale osteoconductive capabile sa actioneze ca un sablon pentru fixarea elementelor responsabile de osteogeneză, acestea trebuie să îndeplinească următoarele deziderate¹⁶:

1. să prezinte biocompatibilitate excelentă astfel încât morfologia și structura tridimensională a scaffold-ului să permită captarea, interacțiunea și eliberarea polipeptidelor factorilor de creștere și/ sau a precursorilor de țesut osos;
2. degradarea și resorbția grefei să fie invers proporțională cu rata de apozitie osoasă; o resorbție prea rapidă ar conduce la periclitarea rezistenței mecanice a grefei, în timp ce o disoluție prea lentă ar împiedica dezvoltarea creșterii țesutului osos; în ambele situații este compromisă vindecarea în condiții naturale;
3. suprafața și rețeaua internă a biomaterialului să poată constitui un mediu propice pentru migrarea prin chemotactism a celulelor responsabile de osteogeneză, cât și diferențierea, creșterea și dezvoltarea acestora.
4. să susțină formarea vaselor de sânge de novo și a invaziei de factori trofici prin porozitatea globală și structura macro- și microporoasă a grefei, care pe lângă vindecarea tridimensională a defectului osos va produce concomitent și metabolizarea biomaterialului; produșii de catabolism rezultați în urma degradării grefei să nu inducă reacții inflamatorii care ar putea împiedica osteogeneza.
5. imediat după aplicarea în defect, granulele biomaterialului aloplastic să adere atât de pereții osoși restanți, cât și între ele acționând ca menținătoare de spațiu; de asemenea proprietățile fizice ale biomaterialului să se exercite atât la interfața cu țesutul osos (periferic) cât și în zonele centrale, împiedicând atât colapsul grefei, cât și invazia de țesut moale; acesta din urmă periclitează vindecarea naturală a osului și mineralizarea biomaterialului aloplastic prin migrarea de fibroblaste cu apariția consecutivă a unui țesut cicatricial de reparație.

Rezultatele bune înregistrate de β -TCP a crescut în ultimii ani interesul pentru acest biomaterial, motiv pentru care asistăm la utilizarea acestuia ca scaffold pentru diverși factori de creștere în regenerarea osoasă. Datorită acestor concluzii încurajatoare, proprietăților fizice, biocompatibilității, cât și a comportamentului chimic excelent am utilizat β -TCP pentru a evalua vindecarea țesutului osos în defecte postextracționale.

Capitolul al II-lea

Concentrate plachetare

Printre numeroasele terapii curente de regenerare ale defectelor osoase maxilare se numără folosirea concentratelor plachetare fie utilizate exclusiv, fie în combinație cu alte proceduri (materiale de adiție osoasă). Acestea sunt reprezentate de fracțiunea trombocitară a sângelui autolog, care obținută prin diferite modalități de centrifugare este apoi inserată la nivelul defectului osos. Indiferent de tiparul centrifugării și al procesării probei sanguine va rezulta divizarea elementelor figurate neimplicate în regenerare (eritrocite) de elementele bioactive terapeutice (trombocite, fibrină, plasmă, leucocite, molecule polipeptidice ca factorii de creștere etc.)¹⁷. Utilizarea acestora oferă avantajul de a îmbogați zona afectată cu elemente sanguine responsabile de regenerare și de a favoriza procesul de reparație, stimulând și grăbind astfel vindecarea.

Luând în considerare momentul în care extractele trombocitare au devenit disponibile, cât și felul în care sunt obținute, se pot clasifica în:

- *adezivi de fibrină*
- *concentrate plachetare de primă generație - plasma bogată în trombocite*
- *concentrate plachetare de a II-a generație - fibrina bogată în trombocite*

Având în vedere această clasificare, în acest rezumat vor fi tratate doar aspectele legate de concentratele plachetare de a II-a generație, insistând în mod particular și exclusiv pe *fibrina bogată în trombocite și leucocite (L-PRF)*.

Descrierea trecutului și caracteristicile curente ale acestor 3 categorii de agregate plachetare nu ar putea fi posibilă fără a face o scurtă referire și a prezenta importanța fibrinei autologe în procesul de vindecare tisulară. Astfel, consecutiv cu apariția hemoragiei, vasele de sânge secționate trebuie etanșezate prin intermediul unui cheag trombocitar rezultat în urma

migrării și agregării plachetare la nivelul zonei de secțiune. Această migrare către fibrele de collagen endoteliale este posibilă prin stimularea trombocitelor prin intermediul canalelor ionice de calciu - $\text{Ca}(2^+)^{18}$ și a factorului-1 derivat din celule stromale (SDF-1)¹⁹; agregarea plachetară este favorizată de serotonină²⁰ (eliberată consecutiv migrării), adenzin-difosfat²¹ (ADP), tromboxan-A2 (TXA2)²², fibrinogen și fibrină²³. Consolidarea cheagului trombocitar are loc prin intermediul proteazei ca trombina, care va scindează monomerii solubili de fibrinogen (fibrinogen) transformându-i în polimeri de fibrină; polimerizarea acestora prin intermediul trombinei va avea ca rezultat o matrice fibrinoasă stabilă și insolubilă. Această matrice de fibrină endogenă va juca un rol deosebit de important în reglarea angiogenezei²⁴, deoarece va constitui un șablon (scaffold) pentru atașarea celulelor endoteliale și a fibroblastelor; pe de altă parte matricea va constitui un rezervor de polipeptide implicate în procesul de vindecare tisulară și în neo-vascularizație ca: factorul de creștere vascular endotelial (vascular endothelial growth factor - VEGF), factorul de creștere al fibroblastelor (fibroblast growth factor - FGF), sau factorul de creștere-1 asemănător insulinei (insulin-like growth factor-1 - IGF-1)²⁵.

Fibrină bogată în trombocite și în leucocite (L-PRF)

Această metodă de obținere a L-PRF este cea mai rapidă, simplă, ieftină și eficientă tehnică de a produce un concentrat plachetar și de aceea este folosită pe scară largă; un motiv în plus pentru utilizarea intensă a L-PRF îl reprezintă faptul că tehnica este liberă, nefiind nevoie de un produs comercial anume ci doar de o centrifugă de biochimie. Pentru aceasta tehnica se va folosi doar recipientul de recoltare al sângelui (fără anticoagulant); din acest motiv L-PRF va fi descris ca fiind un concentrat plachetar de generație secundă (prin eliminarea substanțelor inhibitoare de coagulare, sau a agenților de activare ca trombina animală). Cu alte cuvinte, acesta este produs prin apariția naturală a cheagului de fibrină, toate elementele componente fiind de origine autologă²⁶.

Tehnica originală de obținere a concentratului sub formă de L-PRF debutează prin recoltarea sângelui venos într-un recipient de sticlă de 10 mL fără anticoagulant (vacutainer). Întrucât coagularea sângelui survine de îndată ce acesta ia contact cu pereții recipientului, se recomandă ca centrifugarea sanguină să se efectueze imediat după recoltare; deși protocolul de centrifugare al articolului original de obținere al PRF era reprezentat de 3000 rpm timp de 10 minute, au apărut în ultima vreme studii cu o tehnică de centrifugare de 2700 rpm timp de 12 minute obținându-se același rezultat^{26, 27}. Consecutiv procesării vor rezulta 3 straturi succesive și ascendente: stratul inferior eritocitar atașat de cheagul PRF (stratul intermediar), iar izolat și

în porțiunea superioară a recipientului se va regăsi PPP. Tehnica constă în extragerea cu ajutorul unei pense hemostatice a cheagului de fibrină împreună cu porțiunea eritrocitară atașată și secționarea acestora la interfață, ținând cont că în această porțiune (1/3 inferioară a PRF) se regăsește cea mai mare concentrație de trombocite²⁸. Imediat după secționare, cheagul PRF este aplicat pe o măsuță prevăzută cu perforații, pentru a permite scurgerea serului în exces. Suplimentar, prin aplicarea unei presiuni constante la nivelul cheagului de fibrină (așezat pe măsuța perforată) prin intermediul unui conformator compresiv, PRF poate fi organizat sub forma unor membrane așa cum a fost descris anterior²⁹; acestea pot fi folosite pentru a tapeta, proteja și stabiliza materialele de adiție osoasă în tehnicile de augmentare, sau pentru a fi aplicate sub mucoasa Schneideriana elevată în procedurile de sinus lifting anterior inserției biomaterialelor de adiție²⁸.

Indiferent sub ce formă este preparată PRF, aceasta va avea o serie de avantaje care o propulsează în rândul celor mai utilizate concentrate plachetare. Astfel, procesul de obținere este facil și la dispoziția oricui din moment ce nu necesită o aparatură specială sau tehnici laborioase, produsul final fiind disponibil printr-o singură procesare și printr-un protocol standard și strict; nefiind necesară suplimentarea compusului cu substanțe inhibitoare ale coagulării, sau trombină de origine animală (pentru transformarea fibrinogenului în fibrină), a fost neutralizat riscul de dezvoltare a coagulopatiilor, a tulburărilor de sângerare și a transmiterii bolilor încrucișate. Un alt avantaj este reprezentat de faptul că fibrina reprezintă o structură cu o rezistență și un modul de elasticitate propriu, care poate fi conformată pentru a servi spațiului în care este aplicată; mai mult decât atât, datorită proprietăților mecanice și a consistenței sale ridicate, PRF sub formă de membrană poate fi imobilizată și atașată zonei de interes prin sutură, protejând astfel structurile subiacente reprezentate de cheagul sanguin post-extracțional, sau biomateriale de adiție osoasă³⁰; suplimentar, prin proprietățile sale fizice PRF poate fi folosită ca menținător de spațiu în defecte osoase, iar prin arhitectura tridimensională a acesteia îndeplinește rolul unui scaffold, promovând și stimulând procesul de remaniere tisulară. Rolul fibrinei se exercită prin conținutul ridicat în factori de creștere, citokine proinflamatorii și leucocite care împreună conlucrează în vederea producerii angiogenezei și a modificării metabolismului și fiziologiei zonei de interes. Comparativ cu PRP, PRF produce o eliberare mai îndelungată și mai constantă a factorilor de creștere³¹.

Printre dezavantajele utilizării PRF se numără în primul rând neajunsurile legate de procedeul de obținere al compusului, cantitatea obținută în final putând fi limitată datorită originii strict autologe și neputându-se compensa prin adăugarea cu o substanță exogenă; succesul folosirii PRF depinde de rapiditatea cu care sângele este recoltat și imediat supus

procesului de centrifugare, înainte de a se produce coagularea; deși nu necesită aparatură sofisticată este necesar ca recipientele de recoltare sanguină să fie produse din sticlă sau tapetate în interior cu un strat de sticlă pentru a favoriza formarea cheagului de fibrină³².

În prezent, PRF este folosit pentru a îmbunătăți și a grăbi vindecarea, cât și pentru a reduce complicațiile post-operatorii într-o multitudine de intervenții terapeutice de regenerare osoasă și de țesut moale în sfera chirurgiei orale cum ar fi: proceduri de sinus lifting extern cu încărcare imediată a implanturilor endo-osoase în care PRF este folosit ca singurul biomaterial de augmentare³³, intervenții de preservare alveolară consecutiv extracției dentare³⁴, operații parodontale cu lambou repoziționat coronar combinate cu PRF pentru tratamentul retracțiilor gingivale³⁵, proceduri de regenerare ale defectelor intraosoase parodontale³⁶, sau ale defectelor osoase peri-implantare³⁷.

Partea personală

Capitolul al III-lea

Analiză histomorfometrică a defectelor osoase postextraționale tratate cu beta-fosfat tricalcic (β -TCP) și fibrină bogată în trombocite (PRF)

Scopul studiului

Având în vedere că biomaterialele osoase sintetice au crescut în popularitate în principal datorită avantajelor față de celelalte clase de biomateriale dintre care amintesc disponibilitatea lor permanentă și riscul inexistent de transmitere al bolilor încrucișate, iar faptul ca fibrina bogată în plachete (PRF) este cel mai ușor de obținut datorită minimalizării manipulării sanguine, iar prin prezența cheagului de fibrină încapsulează elementele responsabile de osteoinducție, scopul acestui studiu este de a evalua printr-o analiză de histologie și histomorfometrie vindecarea țesutului osos din interiorul alveolei dentare edentate la nivelul maxilarului de iepure și de a analiza eligibilitatea acestui model experimental în relație cu acest tip de intervenție.

Material și metodă

Model Experimental

În acest studiu au fost implicați 8 iepuri (*Oryctolagus cuniculus*) New-Zealand adulți cu vârste de minim 6 luni și cu o greutate corporală medie de 3150 grame la începutul experimentului. Iepurii au fost cazați în camere individuale cu iluminat artificial controlat (12/12, întuneric/lumină), cu temperatura cuprinsă între 18 - 24°C, umiditatea de 50 ± 20%, ventilație artificială și hrană *ad libitum*. Înainte de debutul studiului iepurii au fost alocați întâmplător în unul din cele două grupuri în funcție de momentul evaluării post-operatorii: la 30 de zile (Lot 1), sau 60 de zile (Lot 2), în fiecare grup fiind 4 iepuri (2 tratați cu β -TCP și 2 cu β -TCP/PRF).

Materiale

Pentru tratamentul de adiție al alveolelor post-extracționale s-a folosit un biomaterial aloplastic de tip β -TCP de fază pură (*Cerasorb® M*, Curasan Inc., Germania), cu o dimensiune a porilor situată între 500 - 1000 μm și cu o granulație situată între 65 - 80%. Acesta a fost aplicat fie exclusiv în interiorul defectului, sau în combinație cu PRF, ambele biomateriale dozându-se în cantități egale. Protocolul de procesare și centrifugare sanguină pentru PRF a fost setat în conformitate cu standardul, reprezentat de 3000 *rpm* timp de 10 minute la o temperatură constantă de 15°C, într-o centrifugă de biochimie *Combi 514R*.

Procedura chirurgicală

Procedura a debutat cu sindesmotomia prin efectuarea unei incizii în festonul gingival al Pm 1 maxilar până la nivelul crestei osoase. Incizia a fost extinsă mezial la nivelul crestei edentate aproximativ 5 mm și distal la nivelul festonului gingival al dintelui vecin, iar consecutiv a fost realizată decolarea țesutului gingival de acestea. Motivul extinderii lamboului plic în special mezial a fost reprezentat de o serie de avantaje legate în principal de: o mai bună vizibilitate a alveolei post-extracționale, evitarea delabrării lamboului, cât și posibilitatea de a sutura margino-marginal plaga post-operatorie. Cu ajutorul unui elevator drept și al cleștelui de extracție (ambele miniaturizate) a fost luxat și extras premolarul 1, iar alveola post-extracțională a fost chiuretată de țesutul parodontal restant și irigată abundant cu soluție de ser fiziologic. Particulele de β -TCP au fost aplicate ca atare după umectarea lor în ser fiziologic, în cantitate de 0,2 - 0,5 grame/defect osos; în cazul amestecului β -TCP/ PRF cantitatea utilizată per alveolă postextracțională a fost de 0,3 – 0,5 grame, cele două materiale fiind dozate în mod egal, după prealabila fragmentare a PRF. Sutura a fost efectuată cu fire separate avându-se grijă să se realizeze închiderea margino-marginală a plăgii și să se protejeze biomaterialele de adiție osoasă; firul de sutură folosit a fost de mătase, grosime 5-0, neresorbabil. Animalele au fost sacrificate în vederea analizei histologice și histomorfometrice la 30 de zile (N= 4) și la 60 de zile (N=4).

Prepararea probelor biologice în vederea analizei histologice

Consecutiv fixării probelor în formol, piesele au fost supuse unui proces de decalcifiere realizat cu o soluție de acid tricloracetic 10% timp de 30 de zile; pentru a asigura eficiența procesului, soluția a fost reînnoită zilnic; decalcifierea probelor a fost considerată completă

când dinții atașați acesteia au înregistrat o consistență moale, iar restul probei osoase a fost apreciată ca fiind flexibilă, chiar elastică la palpare.

Consecutiv secționării probelor biologice în grosimi de aprox. 1 mm, acestea s-au inclus în parafină, iar blocurile au fost tăiate cu ajutorul unui microtom manual în secțiuni de 5 μm fiecare; consecutiv, fiecare lamă histologică a fost colorată cu hematoxină-eozină iar porțiunea centrală a fiecărei probe a fost colorată suplimentar cu albastru de toluidină.

Prepararea secțiunilor histologice în vederea analizei histomorfometrice

Toate lamele histologice obținute au fost scanate cu ajutorul unui scanner electronic (Aperio AT2, Leica Biosystems). Pentru fiecare lamă histologică, a fost identificată zona de interes cu ajutorul unui software digital (ObjectiveView™, Objective Pathology) și a uneltelor de desen și adnotare; în consecință s-au scos în evidență zonele de interes pentru evaluarea histomorfometrică: contururile osoase ale alveolei postextractionale împreună cu țesutul moale gingival supraiacent. Lamele histologice astfel notate au fost trimise via e-mail pentru analiză histomorfometrică Unității de cercetare EA2496, Laboratoires Pathologies, Imagerie et Biothérapies orofaciales, din cadrul Facultății de Chirurgie Dentară a Universității Paris Descartes, Montrouge, Franța

Rezultate

Toate specișenele implicate în studiu s-au vindecat fără complicații, iar biomaterialele de adiție utilizate au fost foarte bine tolerate de-a lungul perioadei de vindecare, atât la 30 cât și la 60 de zile.

Durata procedurii chirurgicale a fost de $1.15 \text{ h} \pm 0.09$ pentru lotul 1 și de $0.57 \text{ h} \pm 0.35$ pentru lotul al doilea.

În ceea ce privește greutatea corporală animalele incluse în studiu au prezentat chiar din prima săptămână post-operator o ușoară creștere în greutate. Evoluția greutății corporale a fost normală, înregistrând o creștere ușoară, sau o menținere în platou din ziua 1 până la sfârșitul perioadei de testare atât per lot cât și individual.

În cele ce urmează vor fi prezentate aspectele analizei histomorfometrice.

Țesut osos nou-format

Media țesutului osos nou-format la 30 de zile pentru specișenele tratate cu β -TCP a fost de $39,52\% \pm 5,19\%$, în timp ce pentru defectele osoase postextractionale tratate cu β -TCP/

PRF a fost de $29,42\% \pm 7,24\%$. Testul *student t* demonstrează o diferență nesemnificativă între cele două tipuri de tratament $p = 0,26$, ambele țesuturi osoase nou-formate fiind asemănătoare din punct de vedere cantitativ.

Media țesutului osos nou-format la 60 de zile pentru speci­menele tratate cu β -TCP a fost de $36,70\% \pm 6,92\%$, în timp ce pentru defectele osoase tratate cu β -TCP/ PRF a fost de $53,88\% \pm 10,53\%$; cu toate acestea testul *student t* arată o diferență nesemnificativă între cele două tipuri de tratament $p = 0,24$, cantitatea țesutului osos format fiind similară din punct de vedere statistic.

Țesutul osos nou-format pentru grupul tratat cu β -TCP la 30 de zile a fost comparat cu grupul tratat cu același biomaterial la 60 de zile pentru a vedea dacă există o diferență de apozitie osoasă în timp. Testul *student t* demonstrează o diferență nesemnificativă între cele două tipuri de tratament $p = 0,77$.

Țesutul osos nou-format pentru grupul tratat cu β -TCP/ PRF la 30 de zile a fost comparat cu grupul tratat cu același biomaterial la 60 de zile pentru a vedea dacă există o diferență în capacitatea de osteogeneză. Testul *student t* demonstrează o diferență nesemnificativă între cele două tipuri de tratament $p = 0,12$, cu toate că diferența numerică între cele două perioade de studiu este de aproape 25% în favoarea β -TCP/ PRF evaluat la 8 săptămâni.

Granule restante de β -TCP

Media particulelor restante de biomaterial aloplastic la 30 de zile pentru speci­menele tratate cu β -TCP a fost de $23,84\% \pm 4,87\%$, în timp ce pentru defectele osoase tratate cu β -TCP/ PRF a fost de $42,7\% \pm 4,93\%$. Testul *student t* demonstrează o diferență nesemnificativă între cele două tipuri de tratament $p = 0,06$.

Media particulelor restante de biomaterial aloplastic la 60 de zile pentru speci­menele tratate cu β -TCP a fost de $21,91\% \pm 3,38\%$, în timp ce pentru defectele osoase tratate cu β -TCP/ PRF a fost de $19,32\% \pm 2,08\%$. Testul *student t* demonstrează o diferență nesemnificativă între cele două tipuri de tratament $p = 0,47$.

Granulele remanente de material aloplastic la 30 de zile pentru grupul tratat cu β -TCP a fost comparat cu speci­menele tratate cu același biomaterial la 60 de zile, pentru a observa dacă există o diferență de evoluție resorbtivă în timp. Astfel, testul *student t* demonstrează o diferență nesemnificativă între cele două tipuri de tratament $p = 0,69$.

Particulele restante de material aloplastic la 30 de zile pentru grupul tratat cu β -TCP/ PRF a fost comparat cu speci­menele tratate cu același biomaterial la 60 de zile, pentru a observa

dacă există o diferență în ceea ce privește degradarea materialului în timp. Astfel, testul *student t* demonstrează o diferență nesemnificativă între cele două tipuri de tratament $p = 0,05$.

Proporția vaselor sanguine/ spațiu gol

Media vaselor sanguine/ spațiului gol la 30 de zile pentru grupul tratat cu β -TCP a fost de $7,42\% \pm 3,76\%$, în timp ce pentru grupul tratat cu β -TCP/ PRF a fost de $18,28\% \pm 2,63\%$. Testul *student t* a demonstrat o diferență nesemnificativă între cele două tipuri de tratament $p = 0,09$.

Media vaselor sanguine/ spațiului gol la 60 de zile pentru grupul tratat cu β -TCP a fost de $27,36\% \pm 7,39\%$, în timp ce pentru grupul tratat cu β -TCP/ PRF a fost de $11,07\% \pm 2,79\%$. Testul *student t* a demonstrat o diferență nesemnificativă între cele două tipuri de tratament $p = 0,16$.

Vasele sanguine/ spațiul gol la 30 de zile pentru speciamele tratate cu β -TCP a fost comparat cu speciamele tratate cu același biomaterial la 60 de zile. Testul *student t* a demonstrat o diferență nesemnificativă între cele două tipuri de tratament $p = 0,11$.

Vasele sanguine/ spațiul gol la 30 de zile pentru speciamele tratate cu β -TCP/ PRF a fost comparat cu speciamele tratate cu același biomaterial la 60 de zile. Testul *student t* a demonstrat o diferență nesemnificativă între cele două tipuri de tratament $p = 0,11$.

Țesut conjunctiv/ spațiu medular

Proporția țesutului conjunctiv/ spațiului medular la 30 de zile pentru grupul tratat cu β -TCP a fost de $29,99\% \pm 2,04$, în timp ce pentru grupul tratat cu β -TCP/ PRF a fost de $14,51\% \pm 3,76\%$. Testul *student t* a demonstrat o diferență nesemnificativă între cele două tipuri de tratament $p = 0,06$.

Proporția țesutului conjunctiv/ spațiului medular la 60 de zile pentru grupul tratat cu β -TCP a fost de $16,66\% \pm 0,72\%$, în timp ce pentru grupul tratat cu β -TCP/ PRF a fost de $17,92\% \pm 7,48\%$. Testul *student t* a demonstrat o diferență nesemnificativă între cele două tipuri de tratament $p = 0,85$.

Țesutul conjunctiv/ spațiul medular la 30 de zile pentru speciamele tratate cu β -TCP a fost comparat cu speciamele tratate cu același biomaterial la 60 de zile. Testul *student t* a demonstrat o diferență semnificativă între cele două tipuri de tratament $p = 0,04$, demonstrând o mai mare cantitate a țesutului conjunctiv/ medular la 4 săptămâni postoperator.

Țesutul conjunctiv/ spațiul medular la 30 de zile pentru speciamele tratate cu β -TCP/ PRF a fost comparat cu speciamele tratate cu același biomaterial la 60 de zile. Testul *student t* a demonstrat o diferență nesemnificativă între cele două tipuri de tratament $p = 0,64$.

Discuții

Acest studiu este primul din literatura de specialitate de acest fel deoarece s-au evaluat printr-o analiză de histomorfometrie efectele a două biomateriale de adiție: aloplastic (β -TCP) și autolog (PRF) asupra procesului de vindecare ale defectelor osoase postextraționale maxilare la iepuri New-Zealand.

Rezultatele obținute în acest studiu histomorfometric sunt diferite de cele prezentate în literatura de specialitate. Astfel, dacă sunt comparate rezultatele acestei cercetări cu un studiu similar apărut recent în care s-au tratat defecte bilaterale din peretele anterior sinusal la iepuri New-Zealand cu TCP sau cu un amestec de PRF/ TCP, rezultă ca acesta din urmă a produs o arie de țesut osos nou-format mai mare decât în cazul defectelor tratate cu TCP³⁸.

Un alt studiu asemănător publicat de curând a analizat efectele utilizării biomaterialului de adiție format din β -TCP + HA utilizat exclusiv, sau în amestec cu PRF pentru regenerarea defectelor osoase de calvarie pe iepuri New-Zealand³⁹. Rezultatele acestui studiu histomorfometric au demonstrat ca există o diferență semnificativă în ceea ce privește formarea de țesut osos nou între zonele tratate cu β -TCP + HA/ PRF comparativ doar cu folosirea β -TCP + HA atât la 4 cât și la 8 săptămâni.

Concluzii

1. iepurele reprezintă un model experimental viabil pentru acest tip de experiment; cu toate acestea trebuie să se respecte cu strictețe metodologia de recoltare sanguină
2. nu există o diferență semnificativă între parametrii evaluați cu excepția țesutului de granulație apărut la 4 săptămâni care este de 2 ori mai abundent comparativ cu săptămâna a 8-a.
3. Cu toate că rezultatele statistice nu sunt semnificative, pentru mare parte din parametrii studiați, analiza histologică pozitivă pare să fie în favoarea grupului tratat cu β -TCP/ PRF

Capitolul al IV-lea

Analiză micro-CT a alveolelor postextractionale tratate cu beta-fosfat tricalcic (β -TCP) și fibrină bogată în trombocite (PRF)

Scopul studiului

Datorită biocompatibilității excelente a β -TCP, având o stoechiometrie similară cu cea a țesutului uman, disponibilitatea sa continuă și posibilitatea de a acționa ca o structură de suport mecanic pentru componentele responsabile de geneza osoasă (osteoconducție) și faptul că PRF-ul este considerat a avea un efect benefic asupra regenerării defectelor osoase prin stimularea proliferării și diferențierii osteoblastelor⁴⁰ și pentru că influența β -TCP cu sau fără PRF nu a fost evaluată până în acest moment la nivelul alveolei postextractionale de iepure, scopul acestui studiu a fost de a evalua printr-o analiză de micro-computer tomograf (micro-CT), cantitatea de țesut osos nou-format în acest tip de defecte osoase la nivelul maxilarului unui model experimental.

Material și metodă

Pentru acest studiu au fost folosiți 6 iepuri adulți New Zealand (*Oryctolagus cuniculus*) din cel de-al doilea lot de modele experimentale (evaluate la 60 de zile postoperator), așa cum au fost descriși în capitolul al III-lea al acestei tezei. Fiecare iepure cu vârsta de minim 6 luni a avut în momentul începerii studiului aproximativ 3000 gr. Studiul a fost realizat în conformitate cu directivele române și europene privind experimentele pe animale, fiind aprobat de Comisia de Etică (CE) din cadrul Institutului Național de Cercetare-Dezvoltare pentru Microbiologie și Imunologie "Cantacuzino", numărul de înregistrare al aprobării fiind CE/38/25.02.2015 și având la bază Standardul Internațional OECD de Bună Practică de Laborator (GLP) - ENV/MC/CHEM(98)17.

Modelul experimental utilizat, biomaterialele de adiție (β -TCP vs. β -TCP/ PRF),

procedura chirurgicală, monitorizarea animalelor, evaluarea clinică și recoltarea probelor biologice sunt identice cu cele prezentate în capitolul al III-lea. Singura excepție este legată de faptul că pentru acest studiu de micro-CT s-au folosit numai iepuri evaluați la 60 de zile de la intervenția chirurgicală.

Consecutiv fixării tisulare efectuate cu formaldehidă 10% și anterior decalcificării, probele au fost trimise prin curierat medical special către Unitatea de cercetare EA2496, Laboratoires Pathologies, Imagerie et Biothérapies orofaciales, din cadrul Facultății de Chirurgie Dentară a Universității Paris Descartes, Montrouge, Franța.

Parametrii analizați

Multipli indici morfometrici au fost calculați folosind software-ul "CT analyzer" (Skyscan, release 1.13.5.1, Kontich, Belgium) iar parametrii analizați în acest studiu au fost reprezentați de volumul tisular, volumul osos, proporția volumului țesutului osos, suprafața osoasă, suprafața specifică osoasă, densitatea osoasă, densitatea osoasă specifică, grosimea trabeculară, numărul trabeculelor osoase, separația trabeculară, factorul tiparului osos trabecular, indexul modelului structural, gradul de anizotropie. Toți acești parametri vor fi sunt detaliați în varianta *in extenso* a tezei de doctorat.

Rezultate

Reprezentanții ambelor grupuri (β -TCP vs. β -TCP/ PRF) din cel de-al doilea lot de studiu (Z60) au putut fi evidențiați și analizați cu ajutorul micro-CT. De regulă, defectul osos post-extracțional a putut fi reperat cu ușurință, niciunul din cele două biomateriale testate nereușind să producă suficientă cantitate de țesut osos astfel încât conturul alveolelor să devină ilizibil. În continuare analizele parametrilor listați în material și metodă și analiza statistică comparativă ale celor două grupuri.

Țesut osos nou-format

Media țesutului osos nou-format pentru speciamele tratate cu β -TCP a fost de 29,31% $\pm$ 6,92%, în timp ce pentru defectele osoase tratate cu β -TCP/ PRF a fost de 40,49% $\pm$ 1,36; cu toate acestea testul *student t* arată o diferență nesemnificativă între cele două tipuri de tratament $p = 0,25$, cantitatea țesutului osos format fiind similară din punct de vedere statistic.

Granule restante de β -TCP

Media particulelor restante de biomaterial aloplastic pentru speci­menele tratate cu β -TCP a fost de $5,61\% \pm 2,27\%$, în timp ce pentru defectele osoase tratate cu β -TCP/ PRF a fost de $5,92\% \pm 1,57\%$. Testul *student t* demonstrează o diferență nesemnificativă între cele două tipuri de tratament $p = 0,85$, resorbția grefei sintetice realizându-se similar.

Suprafața specifică osoasă (SSO)

Media suprafeței specifice osoase pentru speci­menele tratate cu β -TCP a fost de $22,35 \text{ mm}^{-1} \pm 3,07 \text{ mm}^{-1}$, în timp ce pentru defectele osoase tratate cu β -TCP/ PRF valoarea obținută a fost de $23,95 \text{ mm}^{-1} \pm 1,88 \text{ mm}^{-1}$. Testul *student t* demonstrează o diferență nesemnificativă între cele două tipuri de tratament $p = 0,49$, ambele țesuturi osoase nou-formate înregistrând o complexitate similară.

Densitatea osoasă specifică (DOS)

Media densității osoase specifice pentru speci­menele tratate cu β -TCP a fost de $5,75 \text{ mm}^{-1} \pm 0,72 \text{ mm}^{-1}$, în timp ce pentru defectele osoase tratate cu β -TCP/ PRF valoarea obținută a fost de $8,14 \text{ mm}^{-1} \pm 0,67 \text{ mm}^{-1}$. Testul *student t* demonstrează o diferență semnificativă între cele două tipuri de tratament $p = 0,01$, țesutul osos nou-format în cazul β -TCP/ PRF fiind mult mai mineralizat.

Grosimea trabeculară osoasă (GT)

Media grosimii trabeculare pentru speci­menele tratate cu β -TCP a fost de $0,16 \text{ mm} \pm 0,07 \text{ mm}$, în timp ce pentru defectele osoase tratate cu β -TCP/ PRF a fost de $0,19 \text{ mm} \pm 0,04 \text{ mm}$. Testul *student t* demonstrează o diferență nesemnificativă între cele două tipuri de tratament $p = 0,58$, țesutul osos rezultat având un diametru trabecular similar.

Numărul trabeculelor osoase (NT)

Media numărului trabeculelor osoase pentru speci­menele tratate cu β -TCP a fost de $1,34 \text{ mm}^{-1} \pm 0,40 \text{ mm}^{-1}$, în timp ce pentru defectele osoase tratate cu β -TCP/ PRF valoarea obținută a fost de $2,26 \text{ mm}^{-1} \pm 0,14 \text{ mm}^{-1}$. Testul *student t* demonstrează o diferență semnificativă între cele două tipuri de tratament $p = 0,04$, media numărului trabeculelor osoase formate în cazul β -TCP/ PRF fiind aproape de 2 ori mai mare.

Separația trabeculară osoasă (ST)

Media separației trabeculelor osoase pentru speci­menele tratate cu β -TCP a fost de $0,50 \text{ mm} \pm 0,18 \text{ mm}$, în timp ce pentru defectele osoase tratate cu β -TCP/ PRF valoarea obținută a

fost de $0,32 \text{ mm} \pm 0,14 \text{ mm}$. Testul *student t* demonstrează o diferență nesemnificativă între cele două tipuri de tratament $p= 0,25$, ambele țesuturi osoase nou-formate fiind similare din punctul de vedere al spațiilor intertrabeculare.

Indexul modelului structural (IMS)

Indexul modelului structural pentru speci­menele tratate cu β -TCP a fost negativ cum era de așteptat în cazul microarhitecturii spongioase, în care de regulă țesutul osos va avea o dispoziție concavă. Astfel, media indexului modelului structural pentru speci­menele tratate cu β -TCP a fost de $-0,57 \pm 0,39$, în timp ce pentru defectele osoase tratate cu β -TCP/ PRF valoarea obținută a fost de $-0,20 \pm 0,15$. Testul *student t* demonstrează o diferență nesemnificativă între cele două tipuri de tratament $p= 0,23$.

Factorul tiparului osos trabecular (FTT)

Media factorului tiparului osos trabecular pentru speci­menele tratate cu β -TCP a fost de $-5,09 \text{ mm}^{-1} \pm 0,77 \text{ mm}^{-1}$, în timp ce pentru defectele osoase tratate cu β -TCP/ PRF valoarea obținută a fost de $-6,60 \text{ mm}^{-1} \pm 0,37 \text{ mm}^{-1}$. Testul *student t* demonstrează o diferență nesemnificativă între cele două tipuri de tratament $p= 0,059$, raportul interconectivității trabeculare fiind similar pentru țesuturile osoase rezultate din ambele tipuri de tratamente.

Gradul de anizotropie (GA)

Media gradului de anizotropie pentru speci­menele tratate cu β -TCP a fost de $1,15 \pm 0,02$, în timp ce pentru defectele osoase tratate cu β -TCP/ PRF valoarea obținută a fost de $1,46 \pm 0,28$. Testul *student t* demonstrează o diferență nesemnificativă între cele două tipuri de tratament $p= 0,20$, structura osoasă rezultată fiind asimetrică.

Discuții

Acest studiu este singurul din literatura de specialitate în care s-au evaluat printr-o analiză de micro-CT efectele a două biomateriale de adiție: aloplastic (β -TCP) și autolog (PRF) asupra procesului de vindecare ale alveolelor postextra­cționale maxilare la iepuri New-Zealand. În acest studiu am evaluat 9 parametri caracteristici pentru descrierea cantității, microarhitecturii, mineralizării și simetriei țesutului osos nou-format în defectele osoase alveolare. Parametrii semnificativi la 60 de zile după tratamentul de preservare alveolară au

fost reprezentați de *densitatea osoasă specifică* și de *numărul trabeculelor osoase*, ambii în favoarea grupului tratat cu β -TCP/PRF

Un studiu oarecum similar în care a fost evaluată prin analiză de micro-CT influența β -TCP și PRF asupra capacității de regenerare osoasă a apărut în 2015⁴¹. În acesta, deși biomaterialele folosite sunt aceleași ca în studiul prezentat în capitolul al IV-lea al acestei teze, atât distribuția cât și modelul experimental sunt diferite, comparându-se vindecarea osoasă a defectelor de calvarie la șobolani Sprague-Dawley, tratați fie doar cu PRF sau cu PRF/ β -TCP.

Cu toate acestea, rezultatele analizei micro-CT prezentate în acest capitol sunt similare cu cele din studiul anterior menționat și anume că la peste 6 săptămâni, nu există diferențe semnificative statistic între cele două proceduri. Rezultate studiului prezentat în acest capitol sunt și în contradicție dar și asemănătoare cu cele ale unui studiu similar publicat recent⁴², în care au fost evaluate prin CT diferențele de vindecare între defectele osoase femurale tratate fie exclusiv cu PRF, sau cu o combinație de PRF/ β -TCP + HA la iepuri New-Zealand. Astfel, în studiul mai sus amintit, la trei luni postoperator există o diferență extrem de semnificativă în ceea ce privește vindecarea defectelor cu PRF/ β -TCP + HA comparativ cu PRF, în favoarea celui dintâi, producându-se o cantitate mult mai mare a țesutului osos; rezultate prezentate în capitolul al IV-lea al acestei teze contrazic acest fapt. Pe de altă parte, și în cercetarea personală cât și în studiul ante-menționat este acceptat că densitatea țesutului osos *de novo* în cazul tratării defectelor osoase cu amestecul dintre PRF și materialul aloplastic a fost semnificativ mai mare comparativ cu grupul control.

Diferențele semnificative între rezultatele prezentate în acest capitol comparativ cu rezultatele publicate în literatura de specialitate pot fi datorate următoarelor limite și anume: inadvertențelor legate de speciamentele incluse în studii, diferențe în ceea ce privește biomaterialele selectate sau a combinației dintre ele și nu în ultimul rând limita numerică a subiecților incluși în cercetarea personală. Dacă primele două limitări au fost prezentate pe parcursul acestei secțiuni, este important de notat că numărul subiecților incluși în acest capitol a fost redus, fiind reprezentat de 6 iepuri New-Zealand împărțiți în două grupuri în funcție de biomaterialul utilizat la nivelul defectului postextrațional.

Concluzii

Având în vedere rezultatele și limitele prezentate în acest studiu poate fi concluzionat că:

1. amestecul fibrinei bogate în plachete cu beta-fosfatul tricalcic produce un biomaterial compatibil, capabil să susțină vindecarea la nivelul alveolelor postextraționale
2. există o diferență semnificativă între parametrii micro-CT ca densitatea osoasă și numărul trabeculelor osoase de la nivelul defectelor osoase alveolare tratate cu β -TCP/PRF comparativ cu β -TCP, la 8 săptămâni, în favoarea celei dintâi.
3. există o diferență nesemnificativă între vindecarea defectelor osoase alveolare tratate cu β -TCP/PRF comparativ cu β -TCP, la 8 săptămâni, în ceea ce privește: țesutul osos nou-format, granulele remanente de β -TCP, suprafața specifică osoasă, grosimea și separația trabeculară, indexul modelului structural, tiparul osos trabecular și gradul de anizotropie.

Concluzii generale

Având în vedere rezultatele și limitele prezentate în acest studiu poate fi concluzionat că:

1. iepurele reprezintă un model experimental viabil pentru acest tip de experiment; cu toate acestea trebuie să se respecte cu strictețe metodologia de recoltare sanguină
2. nu există o diferență semnificativă între parametrii evaluați cu excepția țesutului de granulație aparut la 4 săptămâni care este de 2 ori mai abundent comparativ cu săptămâna a 8-a.
3. Cu toate că rezultatele statistice nu sunt semnificative, pentru mare parte din parametrii studiați, analiza histologică pozitivă pare să fie în favoarea grupului tratat cu β -TCP/PRF
4. amestecul fibrinei bogate în plachete cu beta-fosfatul tricalcic produce un biomaterial compatibil, capabil să susțină vindecarea la nivelul alveolelor postextraționale
5. există o diferență semnificativă între parametrii micro-CT ca densitatea osoasă și numărul trabeculelor osoase de la nivelul defectelor osoase alveolare tratate cu β -TCP/PRF comparativ cu β -TCP, la 8 săptămâni, în favoarea celei dintâi.
6. există o diferență nesemnificativă între vindecarea defectelor osoase alveolare tratate cu β -TCP/PRF comparativ cu β -TCP, la 8 săptămâni, în ceea ce privește: țesutul osos nou-format, granulele remanente de β -TCP, suprafața specifică osoasă, grosimea și separația trabeculară, indexul modelului structural, tiparul osos trabecular și gradul de anizotropie

Bibliografie

1. **Nudelman F, Bomans P. H. H, George A, de with G, Sommerdijk N. A. J. M,** *The role of the amorphous phase on the biomineralization of collagen*, Faraday Discuss, 2012; 159: 357- 370
2. **Ghosh R, Sarkar R,** *Synthesis and characterization of sintered beta-tricalcium phosphate: A comparative study on the effect of preparation route*. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 2016;67: 345 - 352
3. **Galea L, Böhner M, Thuerling J, Doeblin N, Ring T. A, Aneziris C. G, Graule T.** *Growth kinetics of hexagonal sub-micrometric β -tricalcium phosphate particles in ethylene glycol*. Acta Biomater. 2014; 10(9): 3922 - 3930
4. **Im Y. G, Kook M. S, Kim B. G, Kim J. H, Park Y. J, Song H. J,** *Characterization of a submandibular gland sialolith: micromorphology, crystalline structure, and chemical compositions*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol. 2017: S2212- 4403(17)30115-3
5. **Curtze S. C, Kratz M, Steinert M, Vogt S.** *Step down Vascular Calcification Analysis using State-of-the-Art Nanoanalysis Techniques*. Sci Rep. 2016; 6: 23285
6. **Lee R. S, Kayser M. V, Ali S. Y.** *Calcium phosphate microcrystal deposition in the human intervertebral disc*. J Anat. 2006; 208(1): 13 - 19.
7. **Kikuchi M, Koyama Y, Takakuda K, Miyairi H, Shirahama N, Tanaka J.** *In vitro change in mechanical strength of beta-tricalcium phosphate/copolymerized poly-L- lactide composites and their application for guided bone regeneration*. J Biomed Mater Res. 2002 Nov;62(2):265-72.
8. **Jarcho M.** *Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics*. Clin Orthop. 1981;157: 259 – 278
9. **Doria C, Gallo M,** *Role of Materials in cervical spine fusion*. In Menchetti P. P. M. ed. Cervical Spine, Minimally Invasive and Open Surgery, 1st ed, Springer International Publishing, 2016: 159 - 171

10. **Hulbert S. F, Young F. A, Mathews R. S, Klawitter J. J, Talbert C. D, Stelling F. H,** *Potential of ceramic materials as permanently implantable skeletal prostheses.* J Biomed Mater Res. 1970; 4(3): 433 - 456.
11. **Roy T. D, Simon J. L, Ricci J. L, Rekow E. D, Thompson V. P, Parsons J. R.** *Performance of degradable composite bone repair products made via three- dimensional fabrication techniques.* J Biomed Mater Res A. 2003; 66(2): 283 - 291.
12. **Kuboki Y, Jin Q, Takita H.** *Geometry of carriers controlling phenotypic expression in BMP-induced osteogenesis and chondrogenesis.* J Bone Joint Surg Am. 2001; 83-A Suppl 1(Pt 2): S105 - 115
13. **LeGeros R. Z.** *Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates.* Clin Orthop Relat Res. 2002; (395): 81 - 98.
14. **Eliaz N, Metoki N.** *Calcium phosphate bioceramics: A review of their history, structure, properties, coating technologies and biomedical applications,* Materials, 2017; 10 (4), 334
15. **Lu Z, Zreiqat H.** *Beta-tricalcium phosphate exerts osteoconductivity through $\alpha_2\beta_1$ integrin and down-stream MAPK/ERK signaling pathway.* Biochem Biophys Res Commun. 2010; 394(2): 323 - 329
16. **Lynch E. S,** *Bone regeneration techniques in the orofacial region,* In: Lieberman J. R & Friedlaender G. E (Ed.), Bone regeneration and repair, Biology and clinical applications, Humana Press Inc., Totowa, NJ, 2005: 359 - 390
17. **Dohan Ehrenfest D. M, Rasmusson L, Albrektsson T.** *Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF).* Trends Biotechnol. 2009; 27: 158 - 167
18. **Schmidt E. M, Münzer P, Borst O, Kraemer B. F, Schmid E, Urban B, Lindemann S, Ruth P, Gawaz M, Lang F.** *Ion channels in the regulation of platelet migration.* Biochem Biophys Res Commun. 2011; 415(1): 54 - 60.
19. **Kraemer B. F, Borst O, Gehring E. M, Schoenberger T, Urban B, Ninci E, Seizer P, Schmidt C, Bigalke B, Koch M, Martinovic I, Daub K, Merz T, Schwanitz L, Stellos K,**

- Fiesel F, Schaller M, Lang F, Gawaz M, Lindemann S.** *PI3 kinase- dependent stimulation of platelet migration by stromal cell-derived factor 1 (SDF-1).* J Mol Med (Berl). 2010; 88(12): 1277 - 1288
20. **Duerschmied D, Bode C.** *The role of serotonin in haemostasis.* Hamostaseologie. 2009; 29(4): 356 - 359
21. **Puri R. N, Colman R. W.** *ADP-induced platelet activation.* Crit Rev Biochem Mol Biol. 1997; 32(6): 437 - 502.
22. **Paul B. Z, Jin J, Kunapuli S. P.** *Molecular mechanism of thromboxane A(2)-induced 105 platelet aggregation. Essential role for p2t(ac) and alpha(2a) receptors.* J Biol Chem. 1999; 274 (41): 29108 - 29114.
23. **Lisman T, Weeterings C, de Groot P. G.** *Platelet aggregation: involvement of thrombin and fibrin(ogen).* Front Biosci. 2005; 10: 2504 - 2517.
24. **Hadjipanayi E, Kuhn P. H, Moog P, Bauer A. T, Kuekrek H, Mirzoyan L, Hummel A, Kirchhoff K, Salgin B, Isenburg S, Dornseifer U, Ninkovic M, Machens H. G, Schilling A. F.** *The Fibrin Matrix Regulates Angiogenic Responses within the Hemostatic Microenvironment through Biochemical Control.* PLoS One. 2015 Aug 28;10(8):e0135618
25. **Tsopanoglou N. E. & Maragoudakis M. E.** *The role of thrombin in angiogenesis.* In Tsopanoglou N. E. & Maragoudakis M. E. ed. Thrombin Physiology and disease, 1st ed, Springer-Verlag New York, 2009: 93 - 113
26. **Dohan D. M, Choukroun J, Diss A, Dohan S. L, Dohan A. J, Mouhyi J and Gogly B.** *Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part I: technological concepts and evolution.* Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2006; 101: e37-44
27. **Ghanaati S, Booms P, Orlowska A, Kubesch A, Lorenz J, Rutkowski J, Landes C, Sader R, Kirkpatrick C, Choukroun J.** *Advanced platelet-rich fibrin: a new concept for cell-based tissue engineering by means of inflammatory cells.* J Oral Implantol. 2014; 40(6): 679 - 689
28. **Fioravanti C, Frustaci I, Armellini E, Condò R, Arcuri C, Cerroni L.** *Autologous blood*

preparations rich in platelets, fibrin and growth factors. Oral Implantol (Rome). 2016; 8(4): 96 - 113

29. **Mazor Z, Horowitz R. A, Del Corso M, Prasad H. S, Rohrer M. D, Dohan Ehrenfest D. M.** *Sinus floor augmentation with simultaneous implant placement using Choukroun's platelet rich fibrin as the sole grafting material: a radiologic and histologic study at 6 months.* J Periodontol. 2009; 80(12): 2056 - 2064

30. **Chhabra S, Chhabra N, Vaid P.** *Platelet concentrates: A new alternative to bone regeneration.* Int J Experiment Dent Sci, 2013; 2(2): 118 - 121

31. **Schär M. O, Diaz-Romero J, Kohl S, Zumstein M. A, Nesic D.** *Platelet- rich concentrates differentially release growth factors and induce cell migration in vitro.* Clin Orthop Relat Res. 2015; 473(5): 1635 - 1643

32. **Dohan D.M, Del Corso M, Charrier J-B.** *Cytotoxicity analyses of Choukroun's platelet-rich brin (PRF) on a wide range of human cells: The answer to a commercial controversy.* Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2007; 103: 587-583

33. **Simonpieri A, Choukroun J, Del Corso M, Sammartino G, Dohan Ehrenfest D. M.** *Simultaneous sinus-lift and implantation using microthreaded implants and leukocyte- and platelet-rich fibrin as sole grafting material: a six-year experience.* Implant Dent. 2011; 20(1): 2 - 12

34. **Hauser F, Gaydarov N, Badoud I, Vazquez L, Bernard J. P, Ammann P.** *Clinical and histological evaluation of postextraction platelet-rich fibrin socket filling: a prospective randomized controlled study.* Implant Dent. 2013; 22(3): 295 - 303

35. **Eren G, Atilla G.** *Platelet-rich fibrin in the treatment of localized gingival recessions: a split-mouth randomized clinical trial.* Clin Oral Investig. 2014; 18(8): 1941 - 1948

36. **Sharma A, Pradeep A. R.** *Treatment of 3-wall intrabony defects in patients with chronic periodontitis with autologous platelet-rich fibrin: a randomized controlled clinical trial.* J Periodontol. 2011; 82(12): 1705 - 1712

37. **Hamzacebi B, Oduncuoglu B, Alaaddinoglu E. E.** *Treatment of Peri-implant Bone*

Defects with Platelet-Rich Fibrin. Int J Periodontics Restorative Dent. 2015; 35(3): 415 - 422

38. **Kim B. J, Kwon T. K, Baek H. S, Kim D. S, Kim C. H, Chung I. K, Jeong J. S, Shin S. H,** *A comparative study of the effectiveness of sinus bone grafting with recombinant human bone morphogenetic protein 2-coated tricalcium phosphate and platelet-rich fibrin-mixed tricalcium phosphate in rabbits,* *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2012;113(5): 583-592

39. **Acar A. H, Yolcu Ü, Gül M, Keleş A, Erdem N. F, Altundag Kahraman S.** *Micro-computed tomography and histomorphometric analysis of the effects of platelet-richfibrin on bone regeneration in the rabbit calvarium.* *Arch Oral Biol.* 2015; 60(4): 606 - 614

40. **Kim J, Ha Y, Kang N. H.** *Effects of Growth Factors From Platelet-Rich Fibrin on the Bone Regeneration.* *J Craniofac Surg.* 2017 May 9 doi: 10.1097/SCS.00000000000003396

41. **Abdullah W. A.** *Evaluation of bone regenerative capacity in rats calvarial bone defect using platelet rich fibrin with and without beta tri calcium phosphate bone graft material.* *Saudi Dent J.* 2016; 28(3): 109 - 117

42. **Nacopoulos C, Dontas I, Lelovas P, Galanos A, Vesalas A. M, Raptou P, Mastoris M, Chronopoulos E, Papaioannou N.** *Enhancement of bone regeneration with the combination of platelet-rich fibrin and synthetic graft.* *J Craniofac Surg.* 2014;25(6):2164- 2168.