



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

---

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

# **Biomateriale compozite inovative destinate reabilitării oro-maxilo-faciale**

---

Doctorand: **Mădălina Anca Cotigă**

---

Conducător de doctorat: **Prof. Dr. Radu Septimiu Câmpian**

---

Cluj-Napoca 2016

# CUPRINS

<b>INTRODUCERE</b>	1
<b>STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII</b>	3
<b>1. Particularități anatomo-fiziologice ale structurilor osoase în teritoriul oro-maxilo-facial</b>	5
1.1. Caracteristici anatomice și histologice ale oaselor feței	5
1.2. Remodelarea osoasă și adaptarea osului la mediu	6
1.3. Fractura și vindecarea osoasă	7
<b>2. Reconstrucția osoasă cranio-facială</b>	9
2.1. Tehnici chirurgicale și de inginerie tisulară	9
2.2. Biomateriale utilizate în reconstrucția cranio-facială: implanturile alopastice	13
<b>3. Utilizarea materialelor compozite polimerice armate cu fibre în reabilitarea oro-maxilo-facială</b>	17
3.1. Matrici polimerice utilizate în formularea materialelor compozite cu aplicații medicale	17
3.2. Posibilități de ranforsare a matricilor polimerice	19
3.3. Compatibilizarea fazelor organice și anorganice ale materialelor compozite	21
<b>4. Interacțiunile implant-țesut</b>	23
4.1. Biocompatibilitatea	23
4.2. Reacția tisulară la implantarea biomaterialelor	23
4.3. Contaminarea bacteriană a implanturilor	25
4.3.1. Etapele infecției asociate implantului	25
4.3.2. Strategii antimicrobiene locale	25
<b>CONTRIBUȚIA PERSONALĂ</b>	27
<b>1. Obiective</b>	29
<b>2. Metodologie generală</b>	31
2.1. Selecționarea componentelor biocompozitelor armate cu fibre de sticlă destinate reconstrucției osoase	31
2.1.1. Selecționarea combinațiilor de rășini	31
2.1.2. Selecționarea țesăturilor de fibră de sticlă	31
2.1.3. Selecționarea agentului de cuplare	33
2.2. Prepararea și caracterizarea matricei organice (rășinilor) din biocompozitele armate cu fibre de sticlă destinate reconstrucției osoase	35
2.2.1. Prepararea amestecurilor de monomeri	35
2.3. Prepararea și caracterizarea compozitelor armate cu fibre de sticlă destinate reconstrucției osoase	36
2.3.1. Prepararea compozitelor armate cu fibre de sticlă (FRC)	36
2.3.2. Caracterizarea compozitelor armate cu fibre de sticlă (FRC)	37
2.3.2.1. Caracterizarea matricei polimerice din FRC (întărite) prin metoda spectroscopiei în infraroșu modificată Fourier (FTIR)	37
2.3.2.2. Caracterizarea fibrelor de sticlă silanizate prin FTIR	39
<b>3. Studiul 1 - Determinarea conversiei și a monomerului rezidual corespunzătoare a patru formulări de materiale compozite armate cu fibre de sticlă</b>	41
3.1. Introducere	41
3.2. Obiective	42
3.3. Material și metodă	42

3.3.1. Determinarea dublelor legături reziduale	42
3.3.2. Determinarea monomerului rezidual prin cromatografie de lichide de înaltă performanță (HPLC)	43
3.4. Rezultate	44
3.4.1. Determinarea dublelor legături reziduale	44
3.4.2. Determinarea monomerului rezidual prin HPLC	46
3.5. Discuții	48
3.6. Concluzii	50
<b>4. Studiul 2 - Evaluarea <i>in vitro</i> și <i>in vivo</i> a biocompatibilității materialelor compozite polimerice armate cu fibre de sticlă</b>	51
4.1. Introducere	51
4.2. Obiective	51
4.3. Material și metodă	52
4.3.1. Testarea citotoxicității <i>in vitro</i>	52
4.3.2. Testul de implantare subcutanată	53
4.4. Rezultate	56
4.4.1. Testul de viabilitate celulară <i>in vitro</i>	56
4.4.2. Testul de implantare subcutanată	57
4.5. Discuții	61
4.6. Concluzii	63
<b>5. Studiul 3 - Evaluarea reacției țesuturilor muscular și osos la implantarea biocompozitelor armate cu fibre de sticlă</b>	65
5.1. Introducere	65
5.2. Obiective	66
5.3. Material și metodă	66
5.3.1. Implantarea intramusculară	66
5.3.2. Implantarea intraosoasă	70
5.4. Rezultate	74
5.4.1. Implantarea intramusculară	74
5.4.2. Implantarea intraosoasă	76
5.5. Discuții	82
5.6. Concluzii	85
<b>6. Studiul 4 - Caracterizarea efectului antimicrobian al biocompozitelor armate cu fibre de sticlă obținut prin depunerea externă a gentamicinei</b>	87
6.1. Introducere	87
6.2. Obiective	88
6.3. Materiale și metode	88
6.3.1. Realizarea lotului de testare pentru determinarea efectului antimicrobian	88
6.3.2. Tulpini bacteriene și condiții de cultură	89
6.3.3. Teste de inhibiție bacteriană	90
6.3.4. Testarea adeziunii bacteriene	90
6.3.5. Evaluarea activității antimicrobiene în dinamică	91
6.4. Rezultate	93
6.4.1. Teste de inhibiție bacteriană	93
6.4.2. Teste de aderență bacteriană	95
6.4.3. Evaluarea activității antimicrobiene în dinamică	96
6.5. Discuții	98

6.6. Concluzii	100
<b>7. Studiul 5 – Evaluarea morfologiei, structurii și proprietăților mecanice ale materialului compozit selecționat în urma studiilor biologice</b>	101
7.1. Introducere	101
7.2. Obiective	102
7.3. Material și metode	102
7.4. Rezultate	104
7.5. Discuții	113
7.6. Concluzii	114
<b>8. Concluzii generale</b>	115
<b>9. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei</b>	117
<b>REFERINȚE</b>	119

**Cuvinte cheie:** biomaterial, compozit, reconstrucție osoasă, biocompatibilitate, structură, morfologie, antibacterian

## INTRODUCERE

Cu toate că în ultimele decenii au fost înregistrate progrese notabile în domeniul chirurgiei reconstructive, refacerea structurilor osoase ale complexului cranio-facial, afectate patologic, rămâne o perpetuă provocare, cu atât mai mult cu cât deficitul morfo-funcțional pe care le antrenează la nivelul unui segment anatomic extrem de expus, alterează într-o manieră semnificativă calitatea vieții.

Reabilitarea defectelor osoase cranio-faciale, dar mai ales a disfuncțiilor și dismorfismelor pe care acestea le produc, reprezintă un domeniu de actualitate. Materialele folosite în acest scop sunt de o mare diversitate, de-a lungul timpului fiind utilizate plăci metalice, xenogrefe osoase, grefe osoase allogenice sau autologe, dar și materiale ceramice sau polimerice. Evoluția materialelor și a tehnicilor care deservește reconstrucția osoasă în teritoriul maxilo-facial a avut loc în paralel cu dezvoltarea științifică, tehnică, dar și cu bioetica societății, elementul comun fiind preocuparea neobosită de a găsi materialul ideal. Standardul de aur în reconstrucția osoasă este reprezentat de folosirea grefelor osoase autologe. Din păcate, folosirea grefelor autologe prezintă dificultăți și riscuri legate de morbiditatea suplimentară a situsului donor, de dificultatea și chiar imposibilitatea de a conforma grefa osoasă la forma și dimensiunea situsului receptor. Există, de asemenea, riscuri suplimentare ale rezorbției grefonului osos, precum și riscul de necroză și/sau de infecție. În acest context, utilizarea biomaterialelor în reconstrucția osoasă este direcția salutară spre care să se îndrepte preocupările de cercetare în medicină și în domeniile sale conexe. Mai mult decât atât, pe lângă cerințele obișnuite impuse biomaterialelor utilizate în domeniul medical, cele fabricate în scopuri reconstructive trebuie să poată fi aduse într-o anumită formă tridimensională, prin procedee tehnologice demonstrabile și accesibile, astfel încât valorificarea lor pe piață să fie posibilă și facilă. Din această perspectivă, materialele compozite armate cu fibre de sticlă sunt poate printre cele mai ușor de procesat.

Studiile de față își propun să dezvolte un material inovativ, material compozit polimeric armat cu fibre de sticlă, care să satisfacă în primul rând criteriile de biocompatibilitate, dar care să posede și alte calități legate de specificul reconstrucției osoase cranio-faciale.

## METODOLOGIE GENERALĂ

S-au selectat componentele necesare sintezei materialelor compozite destinate reconstrucției osoase cranio-faciale. S-au formulat și caracterizat patru noi biocompozite (FRC), a căror componentă anorganică, în proporție de 65%, este reprezentată de fibre de sticlă E 300g/m<sup>2</sup>. Matricea polimerică (35%) a avut compoziții diferite: bis-GMA (21%), TEGDMA (14%) pentru FRC 1; bis-GMA (21%), HEMA(14%)

pentru FRC 2; bis-GMA (3,5%), UDMA (21%), TEGDMA (10,5%) pentru FRC 3 și bis-GMA (3,5%), UDMA (21%), HEMA (10,5%) pentru FRC 4. Compatibilizarea fazei organice cu cea anorganică s-a realizat prin intermediul silanului A 174. Materialele compozite s-au obținut prin metoda laminării, iar polimerizarea radicalică inițiată chimic a fost urmată de tratament termic postpolimerizare.

## **STUDIUL 1- DETERMINAREA CONVERSIEI ȘI A MONOMERULUI REZIDUAL CORESPUNZĂTOARE A PATRU FORMULĂRI DE MATERIALE COMPOZITE ARMATE CU FIBRE DE STICLĂ**

### **Obiective**

Având în vedere că gradul de conversie a rășinilor se corelează în mod direct nu doar cu proprietățile fizice și mecanice ale biocompozitelor, ci și cu cele biologice, studiul de față își propune să determine dublele legături reziduale și să evalueze eluția monomerilor reziduali din compozitele întărite.

### **Material și metodă**

Conversia amestecurilor de monomeri din FRC a fost evaluată prin determinarea dublelor legături reziduale (DLR) utilizând metoda spectroscopiei în infraroșu (metoda Ruyter și Gyrosi). Cantitatea de duble legături reziduale a fost determinată ca procent față de cantitatea de grupe metacrilice originale prezente în amestecurile de monomeri (materialul nepolimerizat).

În vederea extracției monomerului rezidual, FRC polimerizate au fost cântărite și imersate apoi în soluție alcoolică (70% alcool etilic și 30% apă), pentru o perioadă de șapte zile, la temperatura camerei. Extractele alcoolice (25 mL) au fost evaporate la sec cu rotaevaporatorul și reluate în 2 ml de acetonitril, filtrate prin filtre PTFE de 0,22 μm și analizate prin cromatografie de lichide de înaltă performanță (HPLC). Analiza monomerului rezidual s-a efectuat pe un cromatograf HPLC Jasco (Japonia). Separarea s-a realizat pe o coloană Lichrosorb RP-C18 (25 x 0,46 cm) la temperatura coloanei de 21°C. Detecția UV a fost realizată la 204 nm pentru a monitoriza eluția tuturor monomerilor (BisGMA, TEGDMA, HEMA și UEDMA) deoarece toți compușii prezintă absorbnanță semnificativă la această lungime de undă. Compușii au fost identificați prin compararea timpilor lor de eluție cu cei ai compușilor de referință, în aceleași condiții de HPLC.

### **Rezultate**

Cea mai mare conversie a monomerilor s-a înregistrat în cazul FRC 3 (85,58%), apoi au urmat în ordine FRC 1 cu conversie de aproximativ 73% și respectiv FRC 2 și FRC 4 ale căror conversii au fost în jur de 63%. Monomerul extras din toate FRC elaborate nu depășește valoarea totală de 0,5% monomeri extrași raportat la greutatea inițială a probei de compozit (0,102% în cazul FRC 1; 0,104% în cazul FRC 2; 0,04% pentru FRC 3; 0,449% pentru FRC 4).

### **Concluzii**

Conversia obținută în cazul FRC 3 se situează peste valorile raportate în literatura de specialitate și se datorează nu doar formulării amestecurilor de rășini, ci și particularităților procesului de polimerizare.

## **STUDIUL 2- EVALUAREA *IN VITRO* ȘI *IN VIVO* A BIOCAMPATIBILITĂȚII MATERIALELOR COMPOZITE POLIMERICE ARMATE CU FIBRE DE STICLĂ**

### **Obiective**

Studiul de față a urmărit atât efectul FRC asupra viabilității celulare *in vitro*, cât și reacțiile tisulare produse la implantarea subcutanată *in vivo*. Prin analiza combinată a acestor două teste considerăm că se ajunge la o mai bună înțelegere a comportamentului biologic al acestor materiale. Mai mult decât atât, prin sumarea rezultatelor obținute la studiul 1, cu cele oferite de studiul de față, se poate alege fără echivoc materialul compozit cu cel mai favorabil comportament din punct de vedere al acceptanței tisulare.

### **Material și metodă**

Celule stem din pulpa dentară (puse la dispoziție de Dr. Olga Sorișău de la Institutul de Oncologie "Prof. Dr. Ion Chiricuță" din Cluj-Napoca) și fibroblaste dermice umane (Promocell, Hamburg, Germany)

au fost menținute în mediu Dulbecco modificat Eagle (Dulbecco's modified Eagle medium - DMEM) suplimentat cu 5% ser fetal de vițel, 50 μg/ml gentamicină și 5 ng/ml amfotericină (Biochrom Ag, Berlin, Germania) la 37°C, 5% CO<sub>2</sub> și atmosferă umidificată. Mediul de cultură condiționat cu probele FRC a fost obținut conform recomandărilor ISO 10993-12:2012. Celulele au fost expuse mediului condiționat din fiecare probă FRC (1-4), nediluat și respectiv diluat (0,5; 0,25; 0,125). Viabilitatea a fost măsurată prin determinarea colorimetrică a unui compus colorant, formazan, generat de celulele viabile, folosind CellTiter 96® Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega Corporation, Madison, SUA). Culturile celulare expuse mediului necondiționat cu FRC au fost utilizate drept grup de control.

Studiul animal a fost efectuat respectând normele impuse și având avizul prealabil al Comisiei de Bioetică a Universității de Medicină și Farmacie "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca. Au fost folosiți 40 de șobolani, masculi, din rasa Wistar, cântărind aproximativ 300-350 g, împărțiți arbitrar în 4 loturi, corespunzătoare materialelor testate. După prealabila anestezie a animalelor, s-a realizat îndepărtarea piloziității și antisepțizarea regiunii dorsale, urmată de inserția subcutanată (cu seringă microcip) a epruvetelor confecționate din FRC. Plaga a fost antisepțizată și nu a necesitat sutură. La sfârșitul perioadei de studiu (30 zile), toate animalele din cele 4 loturi au fost sacrificate. Țesuturile adiacente epruvetelor s-au analizat din punct de vedere macroscopic, apoi au fost prelucrate și analizate microscopic.

### **Rezultate**

Niciuna dintre populațiile celulare nu a arătat semne de citotoxicitate după expunerea la FRC. Scăderea viabilității celulare a fost minoră și a apărut în cazul mediului nediluat pentru FRC 1 și parțial pentru FRC 4. Dintre tipurile de FRC folosite, cele mai bune rezultate s-au obținut în cazul FRC 3, urmat de FRC 2. Aceste materiale au fost bine tolerate de celule la toate concentrațiile și perioadele de incubație. Analiza aspectelor clinice și histologice legate de toleranța tisulară la implantarea subcutanată a epruvetelor din materiale compozite a demonstrat că inflamația din jurul acestora a fost menținută în limite fiziologice. La 30 de zile de la implantare, FRC 3 a produs cea mai ușoară reacție inflamatorie și care s-a corelat cu prezența unei capsule conjunctive bine organizate. Dimpotrivă, FRC 1 a produs cea mai severă reacție inflamatorie.

### **Concluzii**

FRC 3, bazat pe monomerul de uretan dimetacrilat (UDMA), reprezintă cea mai bună formulare din punctul de vedere al comportamentului biologic. Acest aspect se datorează unei conversii chimice mai bune (demonstrată în studiul 1), și este susținut de rezultatele obținute la testele de citotoxicitate *in vitro* și la cele de implantare subcutanată *in vivo*. FRC 3 este selecționat pentru continuarea studiului reacțiilor țesuturilor musculare și osoase.

## **STUDIUL 3 - EVALUAREA REACȚIEI ȚESUTURILOR MUSCULAR ȘI OSOS LA IMPLANTAREA BIOCUMPOZITELOR ARMATE CU FIBRE DE STICLĂ**

### **Obiective**

Testele biologice efectuate cu materialul selectat după prima etapă a cercetării vizează caracterizarea reacției țesuturilor musculare și osoase la implantarea biocompozitelor armate cu fibră de sticlă. Materialul dezvoltat, fiind destinat fabricației de implanturi personalizate pentru refacerea deficitelor osoase în teritoriul maxilo-facial, va fi în vecinătatea unor structuri cu histo-fiziologie particulară, motiv pentru care trebuie aprofundată cercetarea asupra reacțiilor pe care le produce nu numai asupra părților moi (țesut subcutanat, muscular), dar și asupra țesuturilor osoase.

### **Material și metodă**

Studiul animal a fost efectuat respectând normele impuse și având avizul prealabil al Comisiei de Bioetică a Universității de Medicină și Farmacie "Iuliu Hațieganu", Cluj-Napoca. Pentru testul de implantare intramusculară au fost folosiți 10 șobolani, masculi, din rasa Wistar, cântărind aproximativ 300-350 g. După prealabila anestezie a animalelor, s-a realizat îndepărtarea piloziității și antisepțizarea membrului posterior stâng, urmată de inserția chirurgicală intramusculară a epruvetelor confecționate din FRC 3. Plaga a fost suturată în planuri anatomice și antisepțizată. La sfârșitul perioadei de studiu (30 zile), animalele au fost sacrificate, iar țesuturile adiacente epruvetelor s-au analizat din punct de vedere

macroscopic, apoi au fost prelucrate și analizate microscopic. Pentru testul de implantare intraosoasă s-au folosit 16 șobolani masculi din rasa Wistar, cu greutatea medie de 300-350 g. Aceștia au fost împărțiți arbitrar în două loturi - un lot de 12 animale la care s-au implantat intraosos epruvete din FRC 3 și un lot control format din 4 subiecți la care s-au implantat epruvete similare confecționate din titan. După prealabila anestezie a animalelor, s-a realizat îndepărtarea pilozității și antiseptizarea membrului posterior stâng, urmată de expunerea epifizei distale a femurului, trepanarea osoasă și inserția epruvetelor confecționate din FRC 3 și respectiv titan, în canalul medular. Plaga a fost suturată în planuri anatomice și antiseptizată. La 1 lună și respectiv 3 luni, animalele au fost sacrificate, iar țesuturile adiacente epruvetelor au fost prelucrate și analizate microscopic.

### **Rezultate**

Examinarea preparatelor histologice a relevat faptul că implantarea intramusculară a epruvetelor de material compozit a fost bine tolerată. Reacția locală a țesutului muscular a constat în formarea unei capsule fibroase, asociată cu prezența unui infiltrat moderat de tip inflamator cronic și a unor acumulări de celule adipoase. Fibrele musculare care au fost degenerate traumatic în cursul intervenției chirurgicale s-au regenerat. În ceea ce privește implantarea intraosoasă, materialul compozit a determinat reacție tisulară asemănătoare cu cea produsă de epruvetele fabricate din titan, atât la o lună, cât și la trei luni. S-a constatat că ambele materiale introduse în canalul medular se înconjoară într-o primă etapă de o capsulă conjunctivă care, pe măsura trecerii timpului, suferă un proces de osificare pe schiță encondrală. Totuși, în cazul epruvetelor de FRC 3, la 3 luni postimplantare, mai sunt încă persistente zone fine ale unei interfețe conjunctive, slab vascularizate, ceea ce nu se observă în cazul epruvetelor din titan. Semnele de inflamație sunt absente în ambele cazuri, certificând bioacceptarea materialelor. În absența inflamației, pe suprafața ambelor epruvete se depune os cortical viabil, grosimea traveelor osoase pentru cele două tipuri de materiale este sensibil egală, fără să existe diferențe semnificative între loturile studiate ( $p > 0,05$ ), la niciunul dintre intervalurile de timp (1 lună și respectiv 3 luni).

### **Concluzii**

Testele de implantare intramusculară și intraosoasă certifică reacția inflamatorie în limite fiziologice pe care o produc biocompozitele asupra țesuturilor vii. Prezența capsulei subțiri, dar bine organizate, în jurul acestor materiale permite ca ele să fie incluse în categoria de materiale netoxice și inactive. Mai mult decât atât, capsula formată în jurul biomaterialelor implantate endosos, suferă la rândul său un proces de osificare. În concluzie, biocompozitele polimerice armate cu fibre de sticlă sunt potrivite din punct de vedere biologic pentru a fi utilizate ca și substituenți osoși în reconstrucția defectelor scheletice din teritoriul cranio-maxilo-facial.

## **STUDIUL 4 - CARACTERIZAREA EFECTULUI ANTIMICROBIAN AL BIOCOMPOZITELOR ARMATE CU FIBRE DE STICLĂ OBTINUT PRIN DEPUNEREA EXTERNĂ A GENTAMICINEI**

### **Obiective**

Studiul de față își propune să modifice suprafața implanturilor cranio-faciale confecționate din materiale compozite polimerice armate cu fibre de sticlă prin includerea într-un strat extern a gentamicinei. S-a urmărit în ce măsură suprafața implantului astfel modificată inhibă adeziunea bacteriană, are acțiune bactericidă și efect antimicrobian după implantare.

### **Material și metodă**

Au fost utilizate două tulpini bacteriene: *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) și *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).

Pentru studierea inhibiției bacteriene pe care o induc implanturile acoperite cu gentamicină la momentul contactul inițial cu fluidele biologice, au fost utilizate 12 discuri test de 6 mm cu conținut diferit de gentamicină (FRC-G) și alte 2 discuri control (FRC) având aceleași dimensiuni, neacoperite cu antibiotic. Au fost expuse câte două epruvete pe plăci Petri cu agar Muller Hinton inoculat cu 100 $\mu$ l suspensie bacteriană diluată la 10<sup>5</sup> UFC ml<sup>-1</sup>. Plăcile au fost incubate 24 h la 37°C, ulterior măsurându-se diametrele de inhibiție. Pentru a testa aderența bacteriană, epruvetele din materiale compozite (FRC și

FRC-G) au fost plasate în 5 ml suspensie bacteriană ( $1 \times 10^7$  UFC) în tuburi test de 15 ml. După agitare (Heidolph Unimax 1010, Schwabach, Germania) la temperatura camerei timp de 30 de minute, epruvetele au fost spălate cu ser fiziologic, uscate și au fost colectate probe bacteriene de pe suprafață. Bacteriile colectate în microtubi de 2 ml conținând 900  $\mu$ l bulion Tryptic Soy Broth (Liofilchem, Roseto Degli Abruzzi, Italia) s-au omogenizat (Eppendorf 5804 R, Hamburg, Germania) și s-au cultivat pe plăci Petri cu agar Muller Hinton. Măsurătorile UFC au fost efectuate după incubare timp de 24 h la 37°C. Pentru determinarea cantităților de gentamicină eliberate în timp de pe suprafața epruvetelor de tip FRC-G s-a utilizat o metodă lichid cromatografică (HPLC) cu derivatizare pre-coloană utilizând fenilzocianatul ca agent de derivatizare. Extractele obținute au fost folosite ulterior pentru evaluarea activității antimicrobiene printr-o tehnică modificată a microdiluțiilor. S-au folosit plăci de microtitrare cu 96 de godeuri în care au fost introduse diluții diferite din extractele de FRC-G, apoi au fost adăugați câte 10  $\mu$ l de inoculum ( $2 \times 10^5$  UFC/mL) în fiecare dintre cele 96 de godeuri ale fiecărei plăci de microtitrare. După adăugarea a 20  $\mu$ L (0,2 mg/mL) soluție de resazurină în fiecare dintre godeuri, plăcile au fost incubate 2 h la 37°C. Concentrația minimă inhibitorie a fost definită ca fiind cea mai mică concentrație a extractului care a împiedicat reducerea soluției de resazurină (modificarea de culoare).

### **Rezultate**

Bacteriile au fost eficient inactivate prin contactul direct cu învelișurile de gentamicină. De asemenea, s-au atașat mai puține specii de *Staphylococcus aureus* și *Pseudomonas aeruginosa* la epruvetele FRC-G față de cele control FRC. Eliminarea gentamicinei de la nivelul pastilelor de FRC-G se produce în cantități mari în primele trei zile, urmând ca din ziua a patra, valorile să descrească și să se mențină aproape în platou până în ultima zi în care s-au făcut dozări (ziua 14). Valorile obținute pentru concentrația minimă inhibitorie atât pentru *Staphylococcus aureus*, cât și pentru *Pseudomonas aeruginosa* se încadrează între valorile de referință din literatura de specialitate.

### **Concluzii**

Rezultatele celor trei protocoale microbiologice aplicate în acest studiu au sugerat că învelișul de gentamicină inhibă atât creșterea bacteriană, cât și aderarea bacteriilor la suprafața implantului de compozit polimeric ranforsat cu fibre de sticlă. Mai mult decât atât, efectul antimicrobian se menține în timp, prevenind și postoperator contaminarea microbiană a implantului. În concluzie, învelișul de antibiotic al implantelor cranio-faciale poate reduce rata infecțiilor în chirurgia reconstructivă a masivului facial.

## **STUDIUL 5 - EVALUAREA MORFOLOGIEI, STRUCTURII ȘI PROPRIETĂȚILOR MECANICE ALE COMPOZITULUI SELECȚIONAT ÎN URMA STUDIILOR BIOLOGICE**

### **Obiective**

Analiza morfologică de suprafață a avut ca obiectiv determinarea calității implanturilor în termeni de rugozitate a suprafeței și influența coatingului cu gentamicină asupra acestui aspect, prin examinări de microscopie de forță atomică și microscopie electronică de baleiaj. De asemenea, analiza structurală a materialelor compozite experimentale a urmărit să investigheze următoarele aspecte: dacă stuctura materialelor compozite este uniformă sau se constată defecte de material; dacă s-a realizat compatibilizarea corespunzătoare între faza organică și cea anorganică a materialelor compozite; care este influența gradului de armare și a arhitecturii fibrelor de sticlă asupra proprietăților mecanice ale materialelor compozite.

### **Material și metodă**

În colaborare cu Departamentul de Ingineria Fabricației al Universității Tehnice din Cluj-Napoca și Institutul de Cercetări în Chimie "Raluca Ripan" al Univerisității "Babeș Bolyai" din Cluj-Napoca, s-au realizat 3 tipuri de materiale compozite experimentale (MCE). Pentru toate aceste materiale, matricea organică a fost reprezentată de amestecul de rășini selectat în urma studiilor anterioare și anume: UDMA 60%, Bis-GMA 10%, TEGDMA 30%. Diferențele între materiale au fost date de componenta anorganică. Astfel, pentru MCE 1 gradul de armare a fost de 65% și s-a realizat cu țesătură de fibre de sticlă, pentru MCE 2 gradul de armare a fost de 60% și s-a realizat cu țesătură de fibre de sticlă, pentru MCE 3 gradul de



armare a fost de 65% și s-a realizat cu fibre de sticlă unidirecționale extrase din aceeași țesătură folosită la fabricarea MCE 1 și MCE 2. O parte dintre epruvetele confecționate din MCE 1 au fost acoperite cu un strat de gentamicină, după protocolul din studiul 4, și au fost codate MCE 1-G. Pentru analiza morfologică a suprafeței s-au folosit tehnici de microscopie electronică de baleiaj și microscopie de forță atomică. Au fost analizate comparativ suprafețele corespunzătoare MCE 1, MCE 2, MCE 3 și MCE 1-G. Caracterul amorf al materialelor compozite a fost pus în evidență prin difractometrie de raze X. Pentru analiza structurală a materialelor compozite experimentale înainte și după încercările mecanice s-au utilizat tehnici de microscopie electronică de baleiaj.

### **Rezultate**

Analiza morfologică de suprafață a materialelor compozite armate cu fibre de sticlă prin tehnici de microscopie electronică de baleiaj și microscopie de forță atomică a relevat rugozitatea minimală a acestora, cu diferențe de nivel de maxim 30 nm pentru MCE 1- MCE 3. În situația depunerii de suprafață a gentamicinei, diferențele de nivel sunt mai mici, de maxim 8 nm. Analiza structurală a materialelor compozite armate cu fibre de sticlă a evidențiat următoarele aspecte. Calitatea interfeței dintre armătură și matricea organică (obținută prin utilizarea silanului A 174) este foarte bună și își dovedește valoarea în momentul în care epruvetele de materiale compozite sunt supuse forțelor de încovoiere: delaminarea fibrelor de sticlă este parțială, urme de matrice polimerică fiind identificabile pe suprafața acestora. Rezistența la încovoiere a materialelor compozite este influențată direct de gradul de șarjare. Proprietățile mecanice ale materialelor compozite sunt influențate și de geometria armăturii, valori mai mari obținându-se în cazul fibrelor de sticlă dispuse unidirecțional.

### **Concluzii**

Caracterizarea morfologică și structurală a materialelor compozite polimerice armate cu fibre de sticlă demonstrează utilitatea și funcționalitatea acestora în domeniul reconstrucției osoase și validează metodologia de fabricație.

## **CONCLUZII GENERALE**

Cercetările doctorale au permis formularea, caracterizarea și demonstrarea funcționalității unor noi biocompozite polimerice armate cu fibră de sticlă E destinate reconstrucției defectelor scheletice în general și a celor din teritoriul cranio-maxilo-facial în mod particular.

S-au formulat patru matrici organice diferite, pornind de la monomeri de bază Bis-GMA și UDMA și monomeri de diluție TEGDMA și HEMA. Pentru fiecare dintre matricile polimerice s-au studiat gradele de conversie obținute prin polimerizare radicalică inițiată chimic și tratament termic postpolimerizare. Conversia obținută în cazul FRC 3 (UDMA: Bis-GMA: TEGDMA= 6:1:3) este de 85,58% și se situează peste valorile obișnuite raportate în literatura de specialitate (63%). Acest aspect se datorează nu doar formulării amestecurilor de rășini, ci și particularităților procesului de polimerizare. Pentru materialele compozite formulate s-au determinat de asemenea și cantitățile de monomeri reziduali care se pot elibera într-un mediu hidrofil (ca și fluidele tisulare). Cea mai redusă cantitate de monomeri reziduali s-a înregistrat în cazul FRC 3 (0,04%) și este sub valorile de referință din literatura de specialitate (1,2 %).

Ținând cont de scopul de a obține implanturi personalizate, cu forme și dimensiuni particulare, și care să servească reabilitării morfo-funcționale în cazul defectelor osoase maxilo-faciale, s-a concluzionat că rășina R3 (pe bază de UDMA) are cea mai favorabilă formulare, având cel mai mare grad de conversie și eliberând cea mai redusă cantitate de monomer rezidual. Acest rezultat a fost validat atât *in vitro*, asupra două linii celulare diferite cât și *in vivo*, asupra țesuturilor subcutanat, muscular și osos. Rezultatele semnificativ statistice privind păstrarea și chiar stimularea viabilității fibroblastelor dermice umane și a celulelor stem din pulpa dentară, certifică lipsa de toxicitate a materialului dezvoltat și selecționat. Reacțiile țesutului subcutanat și muscular la implantarea FRC 3 au constat în principal în formarea unei capsule fibroase, discret vascularizate, în peretele căreia s-au întâlnit rare celule inflamatorii. Mai mult decât atât, capsula formată în jurul biomaterialelor implantate endoosose, suferă un proces de osificare pe schiță endondrală.

Rezultatele protoalelor microbiologice aplicate au sugerat că învelișul de gentamicină inhibă atât creșterea bacteriană, cât și aderarea bacteriilor la suprafața implantului de compozit polimeric

ranforsat cu fibre de sticlă. Efectul antimicrobian se menține în timp, prevenind și postoperator contaminarea microbiană a implantului. În concluzie, învelișul de antibiotic al implantelor cranio-faciale poate reduce rata infecțiilor în chirurgia reconstructivă a masivului facial.

Analiza morfologică și structurală a materialelor compozite a demonstrat că fibrele de sticlă au fost înglobate corespunzător în matricea polimerică. Studiul structurii biocompozitelor armate cu fibre de sticlă a permis validarea ipotezei inițiale prin care compatibilizarea matricei organice cu cea anorganică s-a realizat cu silanul A 174. Creșterea gradului de armare determină creșterea rezistenței mecanice. Pentru a servi la fabricarea de implanturi personalizate care să reconstruiască defecte osoase, materialele compozite nu trebuie armate excesiv. În urma testelor mecanice de încovoiere, prima dată se rupe matricea organică (se delaminează fibrele) și abia ulterior fibrele de sticlă. Chiar și în condiții de expunere la forțe extreme (mult peste solicitările fiziologice), s-au evidențiat porțiuni ale fibrelor de sticlă de care rășina rămâne atașată. În ceea ce privește componenta anorganică, studiile mecanice au contribuit la selectarea fibrelor de sticlă E sub formă de țesătură bidirecțională. Spre deosebire de țesăturile de fibre de sticlă, armarea cu fibre unidirecționale a condus la valori extrem de mari pentru rezistența mecanică, duritate și modul de elasticitate, cu mult peste valorile osului uman și care ar putea determina în implementarea clinică efecte nocive asupra structurilor osoase adiacente prin "ecranarea stresului".

În concluzie, biocompozitele polimerice armate cu fibre de sticlă sunt potrivite din punct de vedere biologic și mecanic pentru a fi utilizate ca și substituenți osoși în reconstrucția defectelor scheletice din teritoriul cranio-maxilo-facial.

### **ORIGINALITATEA ȘI CONTRIBUȚIILE INOVATIVE ALE TEZEI**

Principalul element inovativ al acestei cercetări este reprezentat de dezvoltarea și caracterizarea unor noi materiale compozite armate cu fibre de sticlă (FRC), pe plan național neexistând preocupări de cercetare în domeniul biocompozitelor de acest tip utilizate în scopul reconstrucției defectelor osoase.

În vederea alegerii celui mai potrivit material care să servească reconstrucției defectelor osoase cranio-faciale, au fost întreprinse o serie de teste atât *in vitro*, cât și *in vivo*, care să demonstreze în primul rând comportamentul biologic favorabil. S-a demonstrat legătura care există între gradul de conversie/monomerul rezidual al rășinilor dimetacrilice și biocompatibilitatea materialelor. În ceea ce privește testele de biocompatibilitate, s-a decis efectuarea studiilor de citotoxicitate în paralel cu cele de implantare, pentru a selecta fără echivoc materialul cu cel mai favorabil comportament biologic, având în vedere că testele efectuate singular pot da rezultate eronate. Alegerea liniilor celulare pe care s-au realizat testele de viabilitate celulară este de asemenea originală, celulele stem din pulpa dentară nemaifiind folosite pentru studierea citotoxicității materialelor compozite polimerice armate cu fibre de sticlă destinate reconstrucției osoase cranio-faciale.

Spre deosebire de materialele de reconstrucție osoasă craniană folosite curent în practica medicală (titan, PMMA, PEEK), biocompozitului formulat i s-au conferit calități antimicrobiene, certificate prin studii microbiologice atât de aderență, cât și de inhibiție bacteriană. Mai mult decât atât s-a reușit ca eliminarea locală a antibioticului depus pe suprafața externă a materialului să se realizeze treptat, cel puțin două săptămâni menținându-se peste concentrația minimă inhibitorie.

În concluzie, biocompozitele dezvoltate în cadrul acestor cercetări pot constitui o alternativă optimizată la materialele similare utilizate în prezent pentru reconstrucția defectelor osoase craniene.



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

---

SUMMARY OF THE PhD THESIS

# **Innovative composite biomaterials for oral and maxillo-facial rehabilitation**

---

Ph.D. Student: **Mădălina Anca Cotigă**

---

Ph.D. Coordinator: **Professor Dr. Radu Septimiu Câmpian**

---

Cluj-Napoca 2016

# TABLE OF CONTENTS

<b>INTRODUCTION</b>	1
<b>CURRENT STATE OF KNOWLEDGE</b>	3
<b>1. Anatomic and physiological particularities of bone structures in oral and maxillofacial area</b>	5
1.1. Anatomical and histological characteristics of facial bones	5
1.2. Bone remodeling and adaptation	6
1.3. Fracture and bone healing	7
<b>2. Craniofacial bone reconstruction</b>	9
2.1. Surgical and tissue engineering techniques	9
2.2. Biomaterials used in craniofacial reconstruction: alloplastic implants	13
<b>3. Fiber-reinforced polymer composites used in oral and maxillo-facial reconstruction</b>	17
3.2. Polymer matrices used in composite materials formulation for medical use	17
3.2. Polymer matrices reinforcements	19
3.3. Bonding organic to inorganic phases of composites biomaterials	21
<b>4. Implant-tissue interaction</b>	23
4.1. Biocompatibility	23
4.2. Tissue reaction to biomaterial implantation	23
4.3. Implant bacterial contamination	25
4.3.1. Stages of implant-related infection	25
4.3.2. Local antimicrobial strategies	25
<b>PERSONAL CONTRIBUTION</b>	27
<b>1. Aims</b>	29
<b>2. General methodology</b>	31
2.1. Selection of the fiber-reinforced composites components for bone reconstruction	31
2.1.1. Selection of monomer mixtures	31
2.1.2. Selection of the glass fiber	31
2.1.3. Selection of the coupling agent	33
2.2. Preparation and characterization of the fiber-reinforced composites resins used in bone reconstruction	35
2.2.1. Preparation of monomer mixtures	35
2.3. Preparation and characterization of the glass fiber-reinforced composites used in bone reconstruction	36
2.3.1. Preparation of fiber-reinforced composites (FRC)	36
2.3.2. Characterization of fiber-reinforced composites (FRC)	37
2.3.2.1. Characterization of FRC polymeric matrix through Fourier transformed infrared spectroscopy method (FTIR)	37
2.3.2.2. Characterization of glass fibers silanized through FTIR method	39
<b>3. Study 1 – Determination of the conversion degree and residual monomer in four formulas of glass fiber-reinforced composite materials</b>	41
3.1. Introduction	41
3.2. Aims	42
3.3. Material and method	42
3.3.1. Determination of the residual double bond	42
3.3.2. Determination of the residual monomer through high-performance liquid chromatography (HPLC)	43
3.4. Results	44
3.4.1. Determination of the residual double bonds	44
3.4.2. Determination of the residual monomer through HPLC	46
3.5. Discussions	48
3.6. Conclusions	50

<b>4. Study 2 – <i>In vitro</i> and <i>in vivo</i> evaluation of glass fiber-reinforced polymeric composite materials biocompatibility</b>	51
4.1. Introduction	51
4.2. Aims	51
4.3. Material and method	52
4.3.1. <i>In vitro</i> cytotoxicity test	52
4.3.2. Subcutaneous implantation test	53
4.4. Results	56
4.4.1. <i>In vitro</i> cellular viability test	56
4.4.2. Subcutaneous implantation test	57
4.5. Discussions	61
4.6. Conclusions	63
<b>5. Study 3 –Evaluation of muscle and bone tissue reaction to implantation of glass fiber-reinforced biocomposites</b>	65
5.1. Introduction	65
5.2. Aims	66
5.3. Material and method	66
5.3.1. Intramuscular implantation	66
5.3.2. Intraosseous implantation	70
5.4. Results	74
5.4.1. Intramuscular implantation	74
5.4.2. Intraosseous implantation	76
5.5. Discussions	82
5.6. Conclusions	85
<b>6. Study 4 –Characterization of the antimicrobial effect of glass fiber-reinforced biocomposites with external gentamicin coating</b>	87
6.1. Introduction	87
6.2. Aims	88
6.3. Materials and methods	88
6.3.1. Preparation of the testing groups	88
6.3.2. Bacterial strains and culture conditions	89
6.3.3. Bacterial inhibition tests	90
6.3.4. Bacterial adherence tests	90
6.3.5. Evaluation of dynamic antimicrobial activity	91
6.4. Results	93
6.4.1. Bacterial inhibition tests	93
6.4.2. Bacterial adherence tests	95
6.4.3. Evaluation of dynamic antimicrobial activity	96
6.5. Discussions	98
6.6. Conclusions	100
<b>7. Study 5 – Evaluation of morphology, structure and mechanical properties of the selected composite, consequent to biological studies</b>	101
7.1. Introduction	101
7.2. Aims	102
7.3. Material and method	102
7.4. Results	104

7.5. Discussions	113
7.6. Conclusions	114
<b>8. General conclusions</b>	115
<b>9. Originality and innovative contributions of the thesis</b>	117
<b>REFERENCES</b>	119

**Keywords:** biomaterial, composite, bone reconstruction, biocompatibility, structure, morphology, antibacterial

## **INTRODUCTION**

The last decades have witnessed notable progress in the field of reconstructive surgery. Despite this, restoration of damaged craniofacial bone structures remains a current challenge, even more because the morphofunctional deficits involved in this exposed anatomic site significantly alter the quality of life.

Rehabilitation of craniofacial bone defects, but mostly the subsequent dysfunctions and dysmorphisms represents an up-to-date domain. The materials used for this purpose cover a broad diversity. Metallic plates, bone xenografts, allogenic and autologous bone grafts, as well as ceramics and polymers have been used over the time. The evolution of materials and techniques of bone reconstruction in the maxillofacial regions benefitted from the scientific and technical development, and was also supported by bioethics of the society, in a permanent quest for the ideal material.

The golden standard in bone reconstruction is represented by the use of autologous bone grafts. Unfortunately, the treatment based on these grafts carries risks and difficulties associated with additional morbidity of the donor site, as well as difficulty in shaping the bone graft to the desired size of the receptor site. There are also additional risks related to the resorption of the bone graft, and risk of necrosis and infection. Given this context, the use of biomaterials for bone reconstruction emerges as the beneficial direction to guide medical and related research. Moreover, in addition to customary requirements of medical biomaterials, the ones fabricated for reconstructive purposes should be 3D moldable, using testable and accessible technological procedures, in order to ensure product marketing. From this standpoint, glass fiber-reinforced composites are probably among the easiest processable materials.

The present studies aimed to develop an innovative polymeric composite reinforced with glass fibers, in order to achieve biocompatibility criteria firstly, but also to possess other distinct features related to craniofacial bone reconstruction.

## **GENERAL METHODOLOGY**

The compounds required for synthesis of the composite materials for craniofacial reconstruction were selected. Four new biocomposites (FRC) were formulated and described: FRC 1, FRC 2, FRC 3, FRC 4. Their inorganic component amounts to 65% and is represented by E 300g/m<sup>2</sup> glass fibers.

The polymeric matrix (35%) had various contents: bis-GMA (21%), TEGDMA (14%) for FRC 1; bis-GMA (21%), HEMA(14%) for FRC 2; bis-GMA (3.5%), UDMA (21%), TEGDMA (10.5%) for FRC 3 and bis-GMA (3.5%), UDMA(21%), HEMA (10.5%) for FRC 4 . Compatibilization of the organic and inorganic phases was achieved using A 174 silane. The composite materials were obtained using the lamination method, whereas the chemically initiated radical polymerization was followed by postpolymerization thermal treatment.

## **STUDY 1- DETERMINATION OF THE CONVERSION DEGREE AND RESIDUAL MONOMER IN THE FOUR FORMULAS OF GLASS FIBER REINFORCED COMPOSITE MATERIALS**

### **Objectives**

Considering that the conversion degree of resins correlates directly to the physical, mechanical and especially to biological properties of biocomposites, the present study aimed to determine the residual double bonds and evaluate the elution of residual monomers in cured composites.

### **Material and method**

The conversion of monomer mixtures in FRC was evaluated by determining the residual double bonds (RDB) using infrared spectroscopy (the Ruyter and Gyorosi method). The amount of RDB was expressed as a percentage of original methacrylic groups in the monomer mixtures (unpolymerized material). In view of the extraction of the residual monomer, the polymerized FRCs were weighed and subsequently immersed in an alcoholic solution (70% ethylic alcohol - 30% water) for 7 days, at room temperature. The alcoholic extracts (25 mL) were dry-evaporated in the rotary evaporator and re-eluted in 2 ml acetonitrile, filtered through 0.22 µm PTFE filters and analyzed using high performance liquid chromatography (HPLC).

The analysis of the residual monomer has been made with an HPLC Jasco chromatograph (Japan). Separation was carried out on a Lichrosorb RP-C18 column (25 x 0.46 cm) at room temperature of 21°C. Detection was performed at 204 nm in order to monitor the elution of all monomers (BisGMA, TEGDMA, HEMA and UEDMA), because all compounds display significant absorbance at this wavelength. The compounds were identified by comparing the elution times with reference values under the same HPLC conditions.

### **Results**

The highest conversion of monomers was found for FRC 3 (85.58%), followed by FRC 1 (73%), FRC 2 and FRC 4 with conversions of about 63% respectively.

The monomer extracted from all elaborated FRC did not exceed the total value of 0,5% monomers referred to the initial weight of the composite specimen (0.102% for FRC 1; 0.104% for FRC 2; 0.04% for FRC 3; 0.449% for FRC 4).

### **Conclusions**

The conversion obtained for FRC 3 surpasses the values reported in the literature and is due not only to the formulation of resins mixtures, but also to particular characteristics of the polymerization process.

## **STUDY 2- *IN VITRO* AND *IN VIVO* EVALUATION OF THE GLASS FIBER REINFORCED POLYMERIC COMPOSITE MATERIALS BIOCOMPATIBILITY**

### **Objectives**

The present study analyzed the effect of FRC on *in vitro* cell viability, as well as tissue reactions produced upon *in vivo* subcutaneous implantation. Using combined analysis of both tests, a better understanding of the biologic behavior of these materials is expected. Moreover, upon summing up the results obtained in Study 1, the composite material with the most favorable behavior in terms of tissue acceptance can be selected unequivocally.

### **Material and method**

Dental pulp stem cells (produced by Dr. Olga Sorişău from the "Prof. Dr. Ion Chiricuţa" Oncologic Institute in Cluj-Napoca) and human dermic fibroblasts (Promocell, Hamburg, Germany) were maintained in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) enriched with 5% calf fetal serum, 50 µg/ml Gentamicin and 5 ng/ml Amphotericin (Biochrom Ag, Berlin, Germany) at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> and humidified atmosphere. The culture medium conditioned with the FRC specimens was fabricated in accordance with the ISO 10993-12:2012 regulations.

The cells have been exposed to the conditioned medium of each specimen FRC (1-4), undiluted and diluted respectively (0.5; 0.25; 0.125). The viability was measured by colorimetric determining of a coloring compound, formazan, generated by the vital cells, using CellTiter 96® Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega Corporation, Madison, USA). The cell cultures that were exposed to the unconditioned medium with FRC were used as a control group.

The animal study was undertaken considering the foreseen regulations and the approval of the Bioethics Committee of the "Iuliu Hatieganu" University of Medicine and Pharmacy in Cluj-Napoca.

Forty male Wistar rats, weighing approximately 300-350 g each were arbitrary divided into 4 groups according to the tested materials. After anesthesia of the animals, removal of the hair and scrubbing of the dorsal region, the FRC test tubes were inserted subcutaneously by means of a microchip syringe. The surgical wound was disinfected and did not necessitate suturing. At the end of the study period (30 days), all animals of the four groups were sacrificed. The tissues adjacent to the test tubes were analyzed macroscopically, then were subsequently processed and analyzed microscopically.

### **Results**

None of the cell populations showed signs of cytotoxicity after exposure to FRC. Reduction of cell viability was minor and appeared in the case of the undiluted medium for FRC 1 and partially for FRC 4. Of all FRC used, FRC 3 yielded the best results, followed by FRC 2. These materials were well tolerated by the cells at all concentrations and periods of incubation. The analysis of clinical and histological aspects linked to tissue tolerance upon subcutaneous implantation of the composite materials test tubes demonstrated that adjacent inflammation remained at physiologic levels. At 30 days post implantation, FRC 3 produced the slightest inflammatory reaction, which could be correlated with a well-organized connective tissue capsule present around the implant. On the contrary, FRC 1 produced the most severe inflammatory reaction.

### **Conclusions**

FRC 3, based on urethane dimetacrylate monomer (UDMA), represents the best formula with regard to the biological behavior. This characteristic is owed to a better chemical conversion (demonstrated in study 1) and is supported by the results obtained at *in vitro* cytotoxicity tests and *in vivo* subcutaneous implantation. FRC 3 was thus selected for the continuation of the study of muscle and bone tissue reactions.

## **STUDY 3 – EVALUATION OF MUSCLE AND BONE TISSUE REACTION TO IMPLANTATION OF GLASS FIBER REINFORCED BIOCOMPOSITES**

### **Objectives**

The biologic tests undertaken on selected material after the first research stage aimed to characterize the muscle and bone tissue reaction at implantation of glass fiber reinforced biocomposites. The material developed for the fabrication of customized implants for the restoration of bone defects in the maxillofacial regions would be surrounded by structures with particular histo-physiology. This fact is the reason for which research on reactions produced on soft tissue (subcutaneous and muscle tissue), as well as bone tissue needs to be done.

### **Material and method**

The animal study was performed respecting the regulations and having the approval of the Bioethics Committee of the „Iuliu Hatieganu” University of Medicine and Pharmacy in Cluj-Napoca. Ten male Wistar rats, weighing approximately 300-350 g each were used for the intramuscular implantation test. After previous anesthesia of the animals, hair removal and disinfection of the left hind leg, surgical intramuscular insertion of FRC 3 test tubes was performed. The wound was sutured according to the anatomical planes and disinfected. At the end of the study period (30 days), the animals were sacrificed and the tissues adjacent to the test tubes were analyzed macroscopically, then processed and analyzed microscopically. Sixteen male Wistar rats with an average weight of 300-350 g were used for the intraosseous implantation test. The animals were arbitrary divided into two groups. A group of 12 animals received FRC 3 test tubes implanted intraosseously and a control group of 4 animals received similar titanium test tubes. After previous anesthesia of the animals, hair removal and disinfection of the



left hind leg was undertaken. The distal epiphysis of the femur was exposed, followed by bone trephining and insertion of the FRC 3 and titanium test tubes in the medullary canal respectively. The wound was sutured according to the anatomical planes and disinfected. At one and 3 months respectively, the animals were sacrificed and the tissue adjacent to the test tubes was processed and analyzed microscopically.

### **Results**

Examination of the histologic specimens revealed the fact that intramuscular implantation of the composite material test tubes was well tolerated. The local reaction of the muscular tissue consisted in the formation of a fibrous capsule, associated with the presence of a moderate chronic inflammatory infiltrate and accumulation of adipous cells. The muscular fibers injured during surgery regenerated further. Regarding the intraosseous implantation, the composite material produced a tissular reaction similar to the titanium test tubes at 1 and 3 months respectively. It could be assessed that both materials inserted into the medullary canal become surrounded by a connective tissue capsule in the first phase. This capsule becomes increasingly enchondral ossified with time. Nevertheless, in the case of the FRC 3 test tubes, narrow areas of a poorly vascularized, connective interface persist at 3 months postimplantation. This, in turn, is not the case for the titanium test tubes. No signs of inflammation could be detected in either case, thus certifying the materials bioacceptance. In an inflammation-free medium, vital cortical bone with lamellas of similar thickness is deposited on the surface of both types of test tubes, without any significant difference between the studied groups ( $p > 0.05$ ), at any time intervals (1 and 3 months).

### **Conclusions**

Intramuscular and intraosseous implantation tests have certified an inflammatory reaction within physiologic limits produced by the biocomposites in the living tissue. The presence of a thin, but well organized capsule around these materials allows their inclusion in the category of nontoxic and inactive materials. In addition, the capsule formed around the materials implanted intraosseously undergoes an ossification process. In conclusion, glass-fiber reinforced polymeric biocomposites are biologically adequate for use as bone substitutes in the reconstruction of cranial and maxillo-facial defects.

## **STUDY 4 – CHARACTERIZATION OF THE ANTIMICROBIAL EFFECT OF GLASS FIBER REINFORCED BIOCOMPOSITES WITH EXTERNAL GENTAMICIN COATING**

### **Objectives**

The present study aimed to modify the surface of the cranio-facial implants fabricated from glass-fiber reinforced polymeric composites by the addition of a Gentamicin external coating. Inhibition of bacterial adhesion, the bactericidal and antimicrobial effect subsequent to implantation were analyzed.

### **Material and method**

Two bacterial strains were utilized: *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) and *Staphylococcus aureus* (ATCC 25932).

In order to study bacterial inhibition induced by Gentamicin coated implants in contact with biologic fluids, 12 test discs of 6 mm diameter with variable content of Gentamicin (FRC-G) and 2 control discs (FRC, without antibiotic) of equal dimension were used. Two test tubes were exposed on each Petri dish with Muller Hinton agar inoculated with 100 $\mu$ l bacterial suspension diluted to 10<sup>5</sup> CFU ml<sup>-1</sup>. The dishes were incubated at 37°C for 24 h, and the inhibition diameters were measured ulteriorly.

For the bacterial adherence test, the composite material test tubes (FRC and FRC-G) were placed in 5 ml bacterial suspension (1 $\times$ 10<sup>7</sup> CFU) in 15 ml tubes. After shaking at room temperature for 30 minutes (Heidolph Unimax Shaker 1010, Schwabach, Germany), the test tubes were rinsed with saline, dried and bacterial swabs samples were collected from the surface. The bacteria collected in 2 ml microtubes containing 900  $\mu$ l Tryptic Soy Broth (Liofilchem, Roseto Degli Abruzzi, Italy) were

homogenized (Eppendorf 5804 R, Hamburg, Germany) and cultivated on Petri dishes with Muller Hinton agar. The CFU measurements were performed after incubation for 24 h at 37°C.

To determine the amount of Gentamicin released over time from the surface of the FRC-G test tubes, a liquid chromatographic method was performed (HPLC) with precolumn derivatization using phenyl isocyanate as derivatization agent. The extracts obtained were used subsequently to evaluate the antimicrobial activity by means of a modified microdilution technique. Microtitration plates with 96 wells were loaded with variable dilutions of the FRC-G extracts. Consecutively, 10 µl of inoculum ( $2 \times 10^5$  CFU/mL) were added to each of the 96 wells of each microtitration plate. After further adding 20 µL (0.2 mg/mL) of resazurin in every well, the plates were incubated for 2 hours at 37°C. The minimum inhibitory concentration (MIC) was defined as the lowest concentration of the extract that inhibited the reduction of the resazurin solution (color change).

### **Results**

The bacteria were efficiently inhibited by direct contact with the Gentamicin coating. Additionally, fewer species of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* attached to the FRC-G test tubes compared to the control FRC. The release of Gentamicin from the FRC-G tablets takes place predominantly during the first 3 days, and decreasingly starting from the 4th day. The values maintain a plateau until the last day of dosage (day 14). The values obtained for MIC for *Staphylococcus aureus* as well as for *Pseudomonas aeruginosa* are in accordance to the reference values cited in the medical literature.

### **Conclusions**

The results of the three microbiological protocols applied in this study ascertain the fact that the Gentamicin coating inhibits bacterial growth, as well as bacterial adhesion to the glass-fiber reinforced polymeric composite implant surface. Moreover, the antimicrobial effect maintains over time, preventing postoperative microbial contamination of the implant. In conclusion, the antibiotic coating of cranio-facial implants might reduce the infection rate in facial reconstructive surgery.

## **STUDY 5 –EVALUATION OF MORPHOLOGY, STRUCTURE AND MECHANIC PROPERTIES OF THE COMPOSITE SELECTED CONSEQUENT TO BIOLOGIC STUDIES**

### **Objectives**

The surface morphologic analysis aimed to determine the implant quality in terms of surface rugosity and the influence of the Gentamicin coating on the rugosity, using atomic force microscopy (AFM) and scanning electron microscopy (SEM). The structural analysis of the composite materials was also intended to determine the following: whether the structure was uniform or presented material defects, whether adequate compatibilization was achieved between the organic and inorganic phase of the materials, what was the influence of the reinforcement degree and the glass fiber architecture on the mechanic properties of the composites.

### **Material and method**

Three types of experimental composite materials (MCE) were fabricated in cooperation between the Department of Fabrication Engineering of the Technical University in Cluj-Napoca and the „Raluca Ripan” Institute for Research in Chemistry of the “Babes Bolyai” University in Cluj-Napoca. For all these materials the organic matrix used was a resin mixture selected based on previous studies: UDMA 60%, Bis-GMA 10%, TEGDMA 30%. The differences between the materials resided in the inorganic component. Thus, for the MCE 1 material, the degree of reinforcement was 65% and it was achieved with woven glass-fiber. For MCE 2 the degree was 60% (woven glass-fiber), while for MCE 3 the degree was 65% and it was obtained using unidirectional glass-fibres extracted from the same fabric used to produce MCE 1 and 2. A part of the test tubes fabricated from MCE 1 were covered with a Gentamicin layer according to the protocol from Study 4, and were coded MCE 1-G. SEM and AFM techniques were used for the morphologic surface analysis. The surfaces corresponding to MCE 1, MCE 2, MCE 3 and MCE 1-G were analyzed comparatively. The amorphous character of the composite materials was evidenced by X-ray

diffraction. SEM was used for the structural analysis of the experimental composite materials, before and after the mechanical tests.

### **Results**

The morphologic surface analysis of the glass-fiber reinforced composite materials using SEM and AFM revealed the minimal rugosity, with differences in the level of maximum 30 nm for MCE 1 – MCE 3. For the Gentamicin coated material, the level differences are lower, of maximum 8 nm. The structural analysis of the glass-fiber reinforced composite materials revealed the following aspects. The quality of the interface between the reinforcement and the organic matrix (obtained by the use of silane A 174) is very good and proves its value when the test tubes are submitted to bending forces: delamination of the glass fibers is partial, and traces of polymeric matrix could be identified on their surface. The bending resistance of the composite materials is directly influenced by the reinforcement degree. The mechanical properties of the composite materials are also influenced by the geometry of the reinforcing net. Higher values are obtained in the case of the unidirectionally disposed glass fibers.

### **Conclusions**

The morphological and structural characterization of the glass-fiber reinforced polymeric composite materials demonstrates their utility and functionality for bone reconstruction and validates the fabrication method.

## **GENERAL CONCLUSIONS**

The present doctoral research allowed the formulation, characterization and demonstration of the functionality of new polymeric E glass-fiber reinforced composites for bone reconstruction in general and cranio-maxillofacial regions in particular.

Four different organic matrices were formulated, based on base monomers (Bis-GMA and UDMA) and dilution monomers (TEGDMA and HEMA). For each of the polymeric matrices, the degrees of conversion obtained through chemically initiated radicalic polymerization and postpolymerization thermic treatment were studied.

The conversion obtained in the case of FRC 3 (UDMA : Bis-GMA : TEGDMA= 6:1:3) was 85.58%, a level above the average values reported in the international specialty literature (63%). This aspect is due not only to the formulation of the resin mixtures, but also to the particularities of the polymerization process. For the formulated composite materials the content in residual monomers that could be released in a hydrophilic environment (similar to the body fluids) was also calculated. The lowest amount of residual monomers was found in the case of FRC 3 (0.04%), a percentage below the reference values quoted in literature (1.2 %). Considering the purpose to obtain customized implants with particular shapes and dimensions, to serve morpho-functional rehabilitation in case of maxillo-facial bone defects, it could be concluded that the R 3 resin (based on UDMA) has the most favorable formulation, with the highest degree of conversion and release of the lowest amount of residual monomer.

This result was validated *in vitro*, on two different cell lines, and *in vivo*, on subcutaneous, muscular and bone tissues as well. The statistical significant results regarding preservation and even stimulation of human dermal fibroblasts and dental pulp stem cells viability certify the lack of toxicity of the developed and selected material.

The reactions of the subcutaneous and muscular tissue to the implantation of FRC 3 consisted primarily in the formation of a fibrous, discretely vascularized capsule, with few inflammatory cells within its wall. Moreover, the capsule formed around the intraosseous placed implants underwent a process of enchondral ossification .

The results of the applied microbiologic protocols suggested that the Gentamicin coating inhibits bacterial growth and bacterial surface adherence on the FRC as well. The antimicrobial effect is maintained over time, preventing contamination of the implant during the postoperative period. In conclusion, the antibiotic coating of cranio-facial implants can reduce the infection rate in reconstructive surgery of the facial skeleton.

The morphologic and structural analysis of the composite materials demonstrated that the glass fibers were properly included in the polymeric matrix. The study of the structure of glass-fiber reinforced biocomposites allowed for the validation of the initial hypothesis according to which compatibilization of the organic and inorganic matrices was achieved with A 174 silane. The increase of the reinforcement degree determines the raise of mechanic resistance. In order to serve the purpose of fabrication of customized implants for bone reconstruction, the composite materials should not be reinforced excessively. During mechanic bending tests, the organic matrix is the first one to break (the fibers become delaminated), followed only ulteriorly by the glass fibers. Even under extreme condition forces (much above physiologic loading), portions of the glass fibers with remaining attached resin were evidenced. Regarding the inorganic component, mechanical studies have contributed to the selection of E glass fibers of bidirectional woven form. In contrast to woven glass fibers, reinforcement with unidirectional glass fibers lead to extremely high values of mechanic resistance, hardness, elasticity modulus, much above the values of human bone, a fact that could determine harmful effects on the adjacent bone in clinical use owing to "stress shielding".

In conclusion, glass-fiber reinforced polymeric composites are suitable from the biologic and mechanic point of view to be used as bone substitutes in the reconstruction of defects of the cranio-maxillofacial skeleton.

### **ORIGINALITY AND INNOVATIVE CONTRIBUTIONS OF THE THESIS**

The main innovative element of this research work is the development and characterization of new glass-fiber reinforced composite materials (FRC). There is no previous documented national research work in the field of this type of biocomposites used for bone defects restoration. In view of selection of the most appropriate material for cranio-facial bone reconstruction, a series of *in vitro* and *in vivo* tests were undertaken, to demonstrate the favorable biologic behavior firstly. The connection between the conversion degree/ the residual monomer of the dimethacrylic resins and the materials biocompatibility was proven. Regarding the biocompatibility tests, it was decided to perform the studies of cytotoxicity in parallel with the implantation studies, in order to select the material with the most favorable biologic behavior unequivocally, considering that singular tests may lead to erroneous results. The selection of cell lines on which the cellular viability tests were undertaken, is also original. The dental pulp stem cells have not been used for the study of cytotoxicity of fiber reinforced polymeric composites for cranio-facial bone reconstruction materials before. In contrast to the currently used cranial bone medical reconstruction materials (titanium, MMA, PEEK), the formulated biocomposite was conferred antimicrobial properties which were certified by microbiological studies of adherence, as well as bacterial inhibition.

Moreover, the gradual local release of the antibiotic applied on the external coating of the material was achieved, with levels exceeding the minimum inhibitory concentration maintaining longer than two weeks. In conclusion, the biocomposites developed as a result of this research may constitute an optimized alternative to similar materials currently used for cranial bone defect restoration.