
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Cercetări clinice și experimentale privind osteointegrarea implanturilor intramedulare moderne acoperite cu biomateriale multisubstituite

Doctorand **Daniel Oltean-Dan**

Conducător de doctorat Prof.dr. **Gheorghe Tomoaia**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	13
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	
1. Structura osoasă	17
1.1. Funcțiile osului	17
1.2. Caracteristici generale ale oaselor	17
1.3. Compoziția și structura oaselor	18
1.4. Structura microscopică a țesutului osos	19
1.5. Mineralizarea matricii osoase	22
2. Metabolismul țesutului osos	23
2.1. Modelarea osoasă	23
2.2. Remodelarea osoasă	23
3. Fiziopatologia leziunilor osoase	27
3.1. Fracturile	27
3.2. Osteoporoza	29
4. Implanturile ortopedice	33
4.1. Materiale pe bază de oțel inoxidabil, titan și tantal	34
4.2. Biomateriale pe bază de hidroxiapatită	39
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	
1. Ipoteza de lucru	43
2. Studiul 1 – Cauzele reviziei artroplastiei totale de șold într-un Centru Regional de Ortopedie	45
2.1. Introducere	45
2.2. Material și metodă	47
2.3. Rezultate	51
2.4. Discuții	55
2.5. Concluzii	57
3. Studiul 2 – Metode de facilitare a consolidării osoase utilizând unde electromagnetice scurte pulsatile de înaltă frecvență și implanturi de titan acoperite cu compozite biomimetice: experiment <i>in vivo</i>	59
3.1. Introducere	59
3.2. Material și metodă	62
3.3. Rezultate	70

3.4. Discuții	80
3.5. Concluzii	89
4. Studiul 3 – Biocompatibilitatea și osteointegrarea implanturilor de titan acoperite cu compozit biomimetic într-un model de șobolan cu fractură de femur	91
4.1. Introducere	91
4.2. Material și metodă	92
4.3. Rezultate	94
4.4. Discuții	99
4.5. Concluzii	103
5. Concluzii generale	105
6. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	107
REFERINȚE	109

CUVINTE CHEIE

Titan, implant, hidroxiapatită, hidroxiapatită multisubstituită, collagen, stronțiu, acoperiri biomimetice, biocompatibilitate, osteointegrare, osteoconductiv, consolidare osoasă, studiu *in vivo*, fractură, artroplastie de șold, revizie, osteoliză aseptică, unde electromagnetice scurte pulsatile de înaltă frecvență.

INTRODUCERE

Creșterea incidenței leziunilor acute sau cronice ale aparatului locomotor și necesitatea intervențiilor chirurgicale de fixare internă cu ajutorul implanturilor, precum și a celor de înlocuire a suprafețelor osoase deteriorate sau a lipsei unor segmente osoase, au orientat cercetarea actuală spre îmbunătățirea calității acestora. Acest fapt a dus la constituirea unor implanturi de calitate superioară și la acoperirea acestora cu materiale biocompatibile ce permit osteointegrarea mai rapidă, consolidarea osoasă mai bună, precum și înlocuirea unor defecte osoase.

Artroplastia totală de șold este tratamentul de elecție în fazele avansate ale coxartrozei sau în cazul fracturilor de col femural, având o rată mare de succes. Cu toate acestea, numărul reviziilor a crescut semnificativ în ultimii ani, atât ca urmare a creșterii speranței de viață, a ratei de utilizare a protezelor primare, precum și a montării protezelor primare la pacienți mai tineri cu activitate fizică intensă. Totuși, complicații precum osteoliza aseptică, care apare tardiv, poate duce la pierderea stabilității componentelor. Nu toate complicațiile artroplastiei primare pot fi prevenite

sau anticipate, însă acestea pot fi limitate prin identificarea factorilor dependenți de pacient ce pot fi optimizați, sau prin acțiuni cu caracter general, precum administrarea de medicamente sistemice ce facilitează anabolismul osos, și cu caracter local, prin utilizarea biomaterialelor cu efect osteoconductiv sau chiar osteoinductiv. Literatura de specialitate identifică multiple posibilități de acoperire a implanturilor metalice convenționale, dar cu aplicabilitate clinică limitată. Pentru a facilita osteointegrarea implanturilor metalice au fost propuse acoperiri pe bază de hidroxiapatită, collagen, proteine ale matricii extracelulare și chiar osteoblaste autologe care se pretează atât în vindecarea, cât și în regenerarea osoasă.

Scopul principal al tezei a fost dezvoltarea unor biomateriale de acoperire a implanturilor metalice, care au compoziția, structura și caracteristici biochimice asemănătoare cu cele ale țesutului osos, cu proprietăți osteoconductive, chiar osteoinductive, cu biocompatibilitate crescută, care să faciliteze osteointegrarea implanturilor, crescându-le durata de viață. Mai mult, s-au evaluat individual și combinat, metode biofizice, precum undele electromagnetice scurte pulsatile de înaltă frecvență și metode biochimice, precum acoperiri pe baza de hidroxiapatită și collagen în procesul de consolidare osoasă și modul cum acesta influențat. Astfel, ca obiectiv secundar, s-a evaluat influența biomaterialelor în procesul de consolidare osoasă și osteointegrare pe un model animal cu fractură a diafizei femurale fixată cu tije intramedulare de titan acoperite cu hidroxiapatită multisubstituită cu stronțiu sau collagen.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

În prima parte sunt prezentate cele mai recente și relevante informații privind structura osoasă macro- și micro-scopice și metabolismul țesutului osos cu cele două procese importante de modelare și remodelare osoasă. Ulterior este descrisă fiziopatologia leziunilor osoase, a fracturilor cu etapele vindecării acestora și a osteoporozei insistând pe impactul socio-economic al acesteia și opțiunile de tratament și de profilaxie a fracturilor pe teren osteoporotic utilizate la momentul actual. În ultima parte sunt descrise implanturile și etapele dezvoltării biomaterialelor utilizate în domeniul ortopedie și traumatologiei, fiind prezentate în detaliu materialele pe bază de oțel inoxidabil, titan, tantal, precum și biomaterialele pe bază de hidroxiapatită. De asemenea, sunt prezentate scenariile posibile ale osteointegrării biomaterialelor pe bază de hidroxiapatită cu cazurile ideale, favorabile, nefavorabile sau chiar dăunătoare și o sinteză a caracteristicilor, avantajelor și dezavantajelor principalelor elemente care pot substitui molecula de hidroxiapatită și au fost utilizate în capitolul Contribuția Personală: siliciu, magneziu, zinc, stronțiu și collagen.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

STUDIUL 1. Cauzele reviziei artroplastiei totale de șold într-un Centru Regional de Ortopedie

Obiective. Scopul studiului actual a fost investigarea principalelor cauze ce au dus la necesitatea reviziei artroplastiei de șold, precum și a intervalului de timp scurs de la artroplastia primară până la cea de revizie. Mai mult, am evaluat existența corelației între vârsta pacientului și indicele de masă corporală, pe de-o parte, și cauza de eșec, respectiv timpul scurs până la revizia artroplastiei primare.

Material și metodă. S-au analizat retrospectiv toate cazurile care au necesitat revizia artroplastiei totale de șold (THA), din Clinica de Ortopedie și Traumatologie "Alexandru Rădulescu" Cluj-Napoca, România, pe o perioadă de 4 ani (ianuarie 2015 și decembrie 2018). Pacienții au fost împărțiți în 3 grupe în funcție de intervalul de timp de la artroplastia primară până la revizia acesteia: grupul I: complicații imediate (<5 ani); grupul II: complicații aparute la o perioadă de timp intermediară (5-10 ani); grupul III: complicații aparute tardiv (>10 ani).

Rezultate. În timpul celor 4 ani de studiu, au fost efectuate 137 de artroplastii de revizie, dintr-un total de 1150 de artroplastii de șold (11,9%). Dintre cei 137 pacienți cu revizia artroplastiei, 56 au fost bărbați și 81 au fost femei, cu o vârstă medie de 69.7 ± 8.7 ani [31-92]. Pacienții care au avut complicații la mai mult de 10 ani după artroplastia primară sunt semnificativ mai în vârstă decât pacienții care au avut complicații la mai puțin de 2 ani ($p=0.008$) sau la mai puțin de 5 ani postoperator ($p=0.02$). În ceea ce privește IMC-ul, pacienții cu complicații după 5 ani au avut un IMC mai mic, cu semnificație statistică pentru grupul III comparativ cu grupul I ($p=0.006$). În ceea ce privește cauzele eșecului artroplastiei primare care au necesită revizie, dintre cei 137 pacienți, 42% au avut decimentare aseptică a uneia sau a ambelor componente protetice ($n=58$), fracturi periprotetice 20% ($n=27$), luxație sau instabilitate 17.5% ($n=24$), infecție 15.5% ($n=21$) și osteoliză 5% ($n=7$). Coeficientul Pearson a identificat o corelație pozitivă scăzută între vârsta pacientului și intervalul de timp dintre artroplastia primară și cea de revizie ($r=0.38$) și o corelație negativă scăzută între IMC și intervalul de timp dintre artroplastia primară și cea de revizie ($r=-0.37$).

Concluzii. Principalele cauze ale reviziilor artroplastiei primare de șold, care apar la mai mult de 10 ani de la intervenția primară, sunt decimentarea aseptică, urmată de osteoliza aseptică. Pacienții trebuie urmăriți periodic de către chirurgul ortoped pentru a monitoriza evoluția și a alege momentul optim pentru revizie. Scăderea în greutate poate prelungi durata de viață a implanturilor.

STUDIUL 2. Metode de facilitare a consolidării osoase utilizând unde electromagnetice scurte pulsatile de înaltă frecvență și implanturi de titan acoperite cu compozite biomimetice: experiment *In vivo*

Ipoteza de lucru. În acest studiu s-a efectuat un studiu experimental, pe model animal de șobolan, la care s-a produs o fractură a diafizei femurale, unde am utilizat două metode cu potențial al facilitării consolidării osoase, reprezentate de unele electromagnetice scurte pulsatile de înaltă frecvență și de tijele de titan acoperite cu hidroxiapatită multsubstituită și colagen (HAPc). Obiectivele principale ale studiului au fost: dezvoltarea unei acoperiri metalice biomimetice și testarea calitativă a acesteia; testarea *in vivo* a tijelor de titan neacoperite și acoperite cu materiale biomimetice, în asociere cu stimularea cu unde electromagnetice scurte pulsatile de înaltă frecvență.

Material și metodă. Studiul a cuprins 32 de șobolani rasa Wistar albino repartizați egal în 4 grupuri: Grupul 1 = CG (grupul martor); Grupul 2 = grup PESW: stimulare biofizică HF-PEMF; Grupul 3 = grup HAPc: implanturi de titan acoperite cu ms-HAP/COL@PLA/COL; Grupul 4 = grup HAPc+PESW: implanturi de titan acoperite cu ms-HAP/COL@PLA/COL și stimulare biofizică HF-PEMF. Inițial s-a dezvoltat biomaterialul de acoperire pe bază de hidroxiapatită multisubstituită și colagen într-o matrice de acid polilactic după care s-au implantat tije de titan acoperite cu biomaterialul dezvoltat la un model de șobolan la care s-a efectuat în prealabil o fractură a diafizei femurale. Începând cu prima zi postoperator, șobolanii din grupurile PESW și HAPc+PESW au fost expuși terapiei cu unde electromagnetice scurte pulsatile de înaltă frecvență (400 pulsații/secundă (pps), 10 minute/zi, șapte zile/săptămână, timp de două săptămâni (14 sesiuni). La 2 respectiv 8 săptămâni, 4 subiecți din fiecare grup au fost eutanasiați și s-au prelevat probele. După analiza detaliată a biomaterialului utilizat, probele biologice au parcurs o examinare histologică, imagistică prin micro-CT, testul de încovoiere mecanică în 3 puncte și analiză serologică. Analiza statistică a fost realizată cu programul GraphPad Prism 6.0.

Rezultate. Markerii serologici osteogenici (fosfataza alcalină și osteocalcina) și analiza micro-CT (în special rezultatele raportului volumului osos/volum tisular total) au indicat la 2 săptămâni următoarea ordine de grup: HAPc+PESW>HAPc≈PESW ($p>0.05$) și HAPc+PESW>control ($p<0.05$). Rezistența mecanică în focarul de fractură a arătat, la 2 săptămâni, cea mai mare valoare medie în grupul HAPc+PESW. Mai mult, analiza histologică a scos la iveală cele mai abundente fibre de colagen asamblate în mănunchiuri dense în grupul HAPc-PESW. La 8 săptămâni, micro-CT a indicat valori mai mari doar în grupul HAPc + PESW față de CG ($p<0.05$), iar rezultatele histologice au arătat o fractură vindecată complet în grupurile HAPc + PESW, HAPc și PESW, dar cu un proces de remodelare osoasă mai avansat în grupul HAPc + PESW.

Concluzii. Utilizarea HF-PEMF, aplicate din prima zi postoperator, 10 minute/zi timp de două săptămâni, facilitează consolidarea osoasă la șobolani, în special în fazele incipiente de vindecare a fracturilor. Mai mult, utilizarea concomitentă a undelor HF-PEMF, împreună cu acoperirea cu HAPc a implanturilor de titan promovează un efect sinergic asupra vindecării fracturilor. În consecință, aceste metode utilizate concomitent pot fi utilizate în aplicațiile clinice, dovedind o abordare superioară pentru modificarea suprafeței implanturilor biomedicale.

STUDIUL 3. Biocompatibilitatea și osteointegrarea implanturilor de titan acoperite cu compozit biomimetic într-un model de șobolan cu fractură de femur.

Obiective. Scopul studiului actual a fost evaluarea osteointegrării tijelor de titan neacoperite și acoperite cu compozite biomimetice într-un model de șobolan cu fractură de femur unilaterală, după stimularea cu unde electromagnetice scurte pulsatile de înaltă frecvență (HF-PEMF). În literatura de specialitate, aceste două procese, consolidarea osoasă și osteointegrarea, sunt evaluate individual, dar în studiul actual a fost evaluat procesul de osteointegrare la un model animal cu fractură de femur, tratat prin două metode de stimulare care și-au dovedit eficiența.

Material și metodă. În cadrul acestui experiment a fost utilizat același model animal conform Studiului 2 (n=32) împărțiți în 4 grupuri egale. După două și opt săptămâni postoperator, probele au fost evaluate prin concentrația serică a markerilor osoși (fosfataza alcalină și osteocalcină), micro-CT și evaluarea histologică în colorație hematoxilină-eozină. De asemenea, am utilizat un alt lot de 40 de subiecți rasa Wistar albino, împărțiți în 5 grupuri la care s-a studiat osteointegrarea implanturilor de titan acoperite cu hidroxiapatită multisubstituită cu magneziu, zinc siliciu (grup martor) și 5% stronțiu, 10% stronțiu, 20% stronțiu și 40% stronțiu, pe care le-am comparat între ele și cu grupul HAPc+PESW.

Rezultate. Dinamica expresiei fosfatazei alcaline și a osteocalcinei, în grupurile expuse la HF-PEMF și tratate cu tije intramedulare de titan acoperite cu hidroxiapatită multisubstituită și collagen, au prezentat valori mai mari la două săptămâni post-chirurgicale, cu activitate osteoblastică mai intensă și o etapă mai avansată a dezvoltării calusului. Rezultatele micro-CT au arătat că acoperirea cu HAPc a crescut semnificativ volumul osos/volumul tisular total (BV/TV), numărul trabeculelor (Tb.N) și grosimea acestora (Tb.Th) și a scăzut semnificativ distanța intertrabeculară (Tb.Sp), comparativ cu grupul de control. Cea mai avansată etapă de remodelare osoasă cu osteointegrarea implantului a fost observată în grupul HAPc+PESW, în cazul în care noul os trabecular format este înlocuit aproape complet de os compact cu dispunerea lamelară de matrice osoasă și osteocite în jurul canalelor Havers.

De asemenea, acoperirile compuse din hidroxiapatită care conțin 10% stronțiu au produs efecte anabolice asupra osului periimplant, cu BV/TV, Tb.Th și Tb.N semnificativ crescute și o scădere semnificativă a Tb.Sp în comparație cu grupul de control în care s-a utilizat hidroxiapatită multisubstituită cu siliciu, magneziu și zinc. Grupurile care conțin în plus 5%, 20% și 40% stronțiu și colagen au fost mai puțin eficiente, dar au produs și ele modificări semnificative ale parametrilor micro-CT, evaluați în comparație cu șobolanii din grupul de control.

Concluzii. Hidroxiapatita multisubstituită cu ioni de siliciu, magneziu, zinc și stronțiu sau colagen pot facilita osteointegrarea implantului pe bază de titan prin îmbunătățirea microstructurii osoase din jurul lor, în timp ce acoperirea cu 10% stronțiu a prezentat cele mai bune proprietăți privind osteointegrarea pe model de șobolan.

CONCLUZII GENERALE

- Deși artroplastia totală a șoldului este o procedură chirurgicală cu rezultate excelente, în majoritatea cazurilor, o mică parte a complicațiilor și eșecurilor rămâne inevitabilă. Principalele cauze ale reviziilor artroplastiei primare de șold, care apar la mai mult de 10 ani de la intervenția primară, sunt decimentarea aseptică, urmată de osteoliza aseptică.
- Există o corelație negativă scăzută între IMC și intervalul de timp dintre artroplastia primară și cea de revizie. În consecință, scăderea în greutate ar prelungi durata de viață a implanturilor.
- Pudra liofilizată de hidroxiapatită multisubstituită și colagen se potrivește cu modelul structurii de hidroxiapatită, prin urmare cantitatea de elemente substituie nu afectează semnificativ gradul de cristalinitate al hidroxiapatitei, iar elementele substituie în cadrul moleculei de hidroxiapatită, HAP- 1.5% Mg - 0.2% Zn - 0.2% Si, sunt încorporate cu succes.
- Compozitul HAPc a fost depus cu succes pe suprafața titanului, având o structură poroasă uniformă, cu fibre de colagen auto-asamblate.
- Stimularea cu HF-PEMF, aplicate din prima zi postoperator, 10 minute/zi timp de două săptămâni, facilitează consolidarea osoasă la șobolani, în special în fazele incipiente de vindecare a fracturilor.
- Utilizarea concomitentă a HF-PEMF și acoperirea implanturilor de titan cu HAPc promovează un efect sinergic asupra vindecării fracturilor, pe un model animal.
- Tijele intramedulare de titan acoperite cu HAPc facilitează osteointegrarea implanturilor de titan prin îmbunătățirea microstructurii osoase din jurul lor.
- Stimularea cu HF-PEMF nu a îmbunătățit osteointegrarea implanturilor de titan, dovedindu-se eficientă numai în facilitarea procesului de consolidare osoasă.

- Hidroxiapatita multisubstituită cu ioni de siliciu, magneziu, zinc și stronțiu sau colagen poate îmbunătăți osteointegrarea implantului pe bază de titan, în timp ce acoperirea cu 10% stronțiu a prezentat cele mai bune proprietăți privind osteointegrarea pe model de șobolan.

ORIGINALITATEA TEZEI

- În cadrul *Studiului 1*, am evaluat retrospectiv principalele cauze de reviziei ale artroplastiei totale primare de șold dintr-un centru regional de Ortopedie și Traumatologie. Acest studiu sublinează importanța acestei patologii și dificultățile tehnice și logistice pe care le ridică, și mai mult, impactul asupra pacientului cu rezultate mai slabe și o recuperare mai anevoioasă. De asemenea, se sublinează necesitatea identificării unor alternative viabile la materialele existente, care să diminueze rata complicațiilor și a rezultatelor nesatisfăcătoare.
- În primul studiu experimental (*Studiul 2*), am evaluat, pentru prima dată în literatura de specialitate, două metode cu potențialul de a facilita consolidarea osoasă. Acestea sunt HF-PEMF și tijele de titan acoperite cu HAPc, utilizate separat și combinat. Stimularea cu HF-PEMF, aplicate din prima zi postoperator, 10 minute/zi timp de două săptămâni, facilitează consolidarea osoasă la șobolani, în special în fazele incipiente de vindecare a fracturilor. Mai mult, utilizarea concomitentă a HF-PEMF și acoperirea cu HAPc a implanturilor de titan promovează un efect sinergic asupra vindecării fracturilor, pe un model animal. Acest biomaterial pe bază de hidroxiapatită multisubstituită și colagen într-o matrice de acid polilactic a fost dezvoltat în cadrul acestui proiect de cercetare, fiind în premieră studiat prin analize calitative, studii in vitro și in vivo.
- În al doilea studiu experimental (*Studiul 3*), în cadrul aceluiași model animal, am evaluat în premieră osteointegrarea implanturilor de titan cu acoperiri biomimetice pe bază de hidroxiapatită multisubstituită și colagen, după stimularea cu HF-PEMF. În literatura de specialitate, aceste două procese, consolidarea osoasă și osteointegrarea, sunt evaluate individual, dar noi am evaluat procesul de osteointegrare la un model animal cu fractură de femur, tratat prin două metode de stimulare care și-au dovedit eficiența. Astfel, am demonstrat că tijele intramedulare de titan acoperite cu HAPc facilitează osteointegrarea implanturilor de titan prin îmbunătățirea microstructurii osoase din jurul lor, în timp ce stimularea cu HF-PEMF nu a îmbunătățit osteointegrarea implanturilor de titan.
- Procesul de osteointegrare a fost evaluat și pe un alt model animal, fără fractură a femurului în care au fost introduse tije intramedulare pe baza de titan acoperit cu hidroxiapatită multisubstituită cu ioni de siliciu, magneziu, zinc și colagen, respectiv stronțiu în procente crescânde (5%, 10%, 20%, 40%). Rezultatele actuale indică faptul că acoperirea cu 10% stronțiu a prezentat cele mai bune proprietăți pentru osteointegrarea implantului la șobolani.

SUMMARY OF THE DOCTORAL THESIS

Clinical and experimental research on the osseointegration of modern intramedullary implants covered with multisubstituted biomaterials

PhD Student **Daniel Oltean-Dan**

PhD Supervisor Prof.dr. **Gheorghe Tomoaia**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION	13
CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	
1. Bone structure	17
1.1. Bone functions	17
1.2. General characteristics of the bones	17
1.3. Bone composition and structure	18
1.4. Microscopic structure of bone tissue	19
1.5. Bone matrix mineralization	22
2. Bone tissue metabolism	23
2.1. Bone modeling	23
2.2. Bone remodeling	23
3. Bone lesions pathophysiology	27
3.1. Bone fractures	27
3.2. Osteoporosis	29
4. Orthopedics implants	33
4.1. Stainless steel, titanium and tantalum materials	34
4.2. Hydroxyapatite-based biomaterials	39
PERSONAL CONTRIBUTION	
1. Background/Objectives	43
2. Study 1 – Revision causes of total hip arthroplasty in a Regional Orthopedic Center	45
2.1. Introduction	45
2.2. Material and method	47
2.3. Results	51
2.4. Discussions	55
2.5. Conclusions	57
3. Study 2 – Enhancement of bone consolidation using highfrequency pulsed electromagnetic short-waves and titanium implants coated with biomimetic composite embedded into PLA matrix: in vivo evaluation	59
3.1. Introduction	59
3.2. Material and method	62
3.3. Results	70

3.4 Discussions	80
3.5. Conclusions	89
4. Study 3 – Biocompatibility and osseointegration of titanium implants coated with biomimetic composite in a rat model of femoral fracture	91
4.1. Introduction	91
4.2. Material and method	92
4.3. Rezultate	94
4.4. Discussions	99
4.5. Conclusions	103
5. General conclusions	105
6. Originality and innovative contributions of the thesis	107
REFERENCES	109

KEYWORDS

Titanium, implant, hydroxyapatite, multisubstituted hydroxyapatite, collagen, strontium, biomimetic coatings, biocompatibility, osseointegration, osteoconductive, bone consolidation, in vivo study, fracture, hip arthroplasty, hip revision, aseptic osteolysis, high frequency pulsed electromagnetic short waves.

INTRODUCTION

Increased incidence of acute or chronic injuries of the locomotor system and the need for internal fixation surgery with implants, as well as those for the replacement of damaged bone surfaces or the lack of bone segments, have guided the current research to improve their quality. This has led to the establishment of high quality implants and their coverage with biocompatible materials that allow for faster bone integration, better bone consolidation, as well as the replacement of bone defects.

Total hip arthroplasty is the treatment of choice in advanced phases of hip arthrosis or in the case of femoral neck fractures, with a high success rate. However, the number of revisions has increased significantly in recent years, both as a result of increased life expectancy, the rate of use of primary prostheses, as well as the primary arthroplasty in younger patients with intense physical activity. Complications such as late-onset aseptic osteolysis can lead to loss of component stability. Not all the complications of primary arthroplasty can be prevented or anticipated, but they can be

limited by identifying patient-dependent factors that can be optimized, or by general actions, such as the administration of systemic drugs that facilitate bone anabolism, and locally, by the use of biomaterials with osteoconductive or even osteoinductive effect. The literature identifies multiple possibilities of covering conventional metal implants, but with limited clinical applicability. In order to facilitate the osteointegration of the metal implants, coatings based on hydroxyapatite, collagen, extracellular matrix proteins and even autologous osteoblasts have been proposed that are suitable for both healing and bone regeneration.

The main purpose of the thesis was the development of biomaterials to cover the metallic implants, which have the composition, structure and biochemical characteristics similar to those of the bone tissue, with osteoconductive properties, even osteoinductive, with increased biocompatibility, that facilitate the osteointegration of the implants, increasing their lifetime. Furthermore, biophysical methods, such as high frequency pulsed electromagnetic short waves and biochemical methods, such as hydroxyapatite and collagen based coatings in the bone consolidation process, were evaluated individually and in combination. Thus, as a secondary objective, the influence of biomaterials in the process of bone consolidation and osteointegration was evaluated on an animal model with fracture of the femoral diaphysis fixed with intramedullary titanium nails coated with strontium or collagen-substituted hydroxyapatite.

CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

The first part of the thesis presents the most recent and relevant information regarding the macro- and micro-scopic bone structure and the bone tissue metabolism, with two important processes of bone modeling and remodeling. The pathophysiology of bone lesions, fractures with their healing stages and osteoporosis is described below, insisting on its socio-economic impact and the treatment and prophylaxis options for osteoporotic fractures, that are currently used. The last part describes the implants and the development stages of the biomaterials, that are used in the field of orthopedics and traumatology, being presented in detail the materials based on stainless steel, titanium, tantalum, as well as the biomaterials based on hydroxyapatite. Also, the possible scenarios of osteointegration of hydroxyapatite biomaterials with the ideal, favorable, unfavorable or even harmful cases and a summary of the characteristics, advantages and disadvantages of the main elements that can replace the hydroxyapatite molecule which have been used in the chapter Personal Contribution are presented: silicon, magnesium, zinc, strontium and collagen.

PERSONAL CONTRIBUTION

STUDY 1. Revision causes of total hip arthroplasty in a Regional Orthopedic Center

Objectives. The aim of the current study was to investigate the main causes that led to the need for hip arthroplasty revision, as well as the time elapsed from primary to revision arthroplasty. Moreover, we evaluated the correlation between the patient's age and the body mass index, respectively the cause of failure and the time elapsed until the revision of the primary arthroplasty.

Material and method. We retrospectively analyzed all the cases that required the revision of total hip arthroplasty (THA), from the Orthopedics and Traumatology Clinic "Alexandru Rădulescu" Cluj-Napoca, Romania, for a period of 4 years (January 2015 and December 2018). Patients were divided into 3 groups according to the time interval from primary arthroplasty to its revision: group I: immediate complications (<5 years); group II: complications occurring at an intermediate time period (5-10 years); group III: late complications (> 10 years).

Results. Between 2015 and 2018, 137 revision arthroplasties were performed, out of a total of 1150 hip arthroplasties (11.9%). Of the 137 patients with arthroplasty revision, 56 were male and 81 were female, with a mean age of 69.7 ± 8.7 years [31-92]. Patients who had complications more than 10 years after primary arthroplasty are significantly older than patients who had complications in less than 2 years ($p = 0.008$) or less than 5 years postoperatively ($p = 0.02$). Regarding BMI, patients with complications after 5 years had a lower BMI, with statistical significance for group III compared to group I ($p = 0.006$). Regarding the causes of primary arthroplasty failure that required revision, of the 137 patients, 42% had aseptic loosening of one or both prosthetic components ($n = 58$), 20% periprosthetic fractures ($n = 27$), dislocation or instability 17.5% ($n = 24$), infection 15.5% ($n = 21$) and osteolysis 5% ($n = 7$). The Pearson coefficient identified a low positive correlation between the patient's age and the time interval between primary and revision arthroplasty ($r = 0.38$) and a low negative correlation between BMI and the time interval between primary and revision arthroplasty ($r = -0.37$).

Conclusions. The main causes of primary hip arthroplasty revisions, which occur more than 10 years after primary intervention, are aseptic loosening, followed by osteolysis. Patients should be monitored periodically by the orthopedic surgeon to evaluate their progress and choose the optimal time for revision. Weight loss can extend the life of total hip prosthesis.

STUDY 2. Enhancement of bone consolidation using highfrequency pulsed electromagnetic short-waves and titanium implants coated with biomimetic composite embedded into PLA matrix: in vivo evaluation

Hypothesis. In this experimental study, on a rat animal model, with a fracture of the femoral shaft, were used two methods with the potential to facilitate bone consolidation, represented by high frequency pulsed electromagnetic short waves and titanium nails coated with multisubstituted hydroxyapatite and collagen (HAPc). The main objectives of the study were: the development of a biomimetic metal coating and its qualitative testing; in vivo testing of uncoated and coated titanium nails with biomimetic materials, in association with high frequency pulsed electromagnetic short waves stimulation.

Material and method. The study included 32 albino Wistar rats equally divided into 4 groups: Group 1 = CG (control group); Group 2 = PESW group: HF-PEMF biophysical stimulation; Group 3 = HAPc group: titanium implants coated with ms-HAP / COL @ PLA / COL; Group 4 = HAPc + PESW group: titanium implants coated with ms-HAP / COL @ PLA / COL and HF-PEMF biophysical stimulation. Initially, the coating biomaterial based on multisubstituted hydroxyapatite and collagen was developed in a polylactic acid matrix, after which titanium nails coated with the developed biomaterial were implanted in a rat model in which a fracture of the femoral shaft was previously performed. From the first postoperative day, rats in the PESW and HAPc + PESW groups were exposed to high-frequency pulsed electromagnetic short waves therapy (400 pulses / second (pps), 10 minutes / day, seven days / week for two weeks). At 2 and 8 weeks respectively, 4 subjects from each group were euthanized and sampled. After the detailed analysis of the biomaterial used, the biological samples underwent a histological examination, micro-CT imaging, mechanical bending test in 3 points and serological analysis. The statistical analysis was performed with GraphPad Prism 6.0.

Results. Osteogenic serological markers (alkaline phosphatase and osteocalcin) and micro-CT analysis (especially the results of the bone volume / total tissue volume ratio) indicated at 2 weeks the following group order: HAPc + PESW > HAPc ≈ PESW ($p > 0.05$) and HAPc + PESW > control ($p < 0.05$). The mechanical strength in the fracture point showed, at 2 weeks, the highest average value in the HAPc + PESW group. Moreover, histological analysis revealed the most abundant collagen fibers assembled in dense bundles in the HAPc-PESW group. At 8 weeks, micro-CT showed higher values only in the HAPc + PESW group compared to CG ($p < 0.05$), and histological results showed a completely healed fracture in the HAPc + PESW, HAPc and PESW groups, but with a more advanced bone remodeling process in the HAPc + PESW group.

Conclusions. The HF-PEMF therapy, applied from the first postoperative day, 10 minutes / day for two weeks, facilitates bone consolidation in rats, especially in the early stages of fracture healing. Moreover, the concomitant use of HF-PEMF therapy, together with HAPc coating of titanium implants promotes a synergistic effect on fracture healing. Consequently, concomitantly used of these methods can be used in clinical applications, proving a superior approach to changing the surface of biomedical implants.

Study 3 - Biocompatibility and osseointegration of titanium implants coated with biomimetic composite in a rat model of femoral fracture

Objectives. The aim of the study was to evaluate the osseointegration of uncoated and coated titanium nails with biomimetic composites in a rat model with unilateral femoral fracture, after high frequency pulsed electromagnetic short waves (HF-PEMF) stimulation. In the literature, these two processes, bone consolidation and osseointegration, are evaluated individually, but in the current study the process of osseointegration was evaluated in an animal model with femoral fracture, treated by two stimulation methods that proved their effectiveness.

Material and method. In this experiment the same animal model was used according to Study 2 (n = 32) divided into 4 equal groups. After two and eight weeks postoperatively, the samples were evaluated by serum concentration of bone markers (alkaline phosphatase and osteocalcin), micro-CT and histological evaluation in hematoxylin-eosin staining. We also used another batch of 40 Wistar albino subjects, divided into 5 groups where the osseointegration of titanium implants coated with multisubstituted hydroxyapatite with magnesium, silicon zinc (control group) and 5% strontium, 10% strontium, 20% strontium and 40% strontium was studied, and the results were compared with the HAPc + PESW group.

Results. The dynamics of alkaline phosphatase and osteocalcin expression, in the HF-PEMF exposed groups and treated with intramedullary titanium rods coated with multisubstituted hydroxyapatite and collagen, showed higher values at two weeks post-surgery, with more intense osteoblastic activity and a more advanced stage of callus development. Micro-CT results showed that HAPc coating significantly increased bone volume / total tissue volume (BV / TV), number of trabeculae (Tb.N) and their thickness (Tb.Th) and significantly decreased intertrabecular distance (Tb.Sp) compared to the control group. The most advanced stage of bone remodeling with implant osseointegration was observed in the HAPc + PESW group, where the newly formed trabecular bone is almost completely replaced by compact bone with lamellar arrangement of bone matrix and osteocytes around the Haversian canals.

Furthermore, hydroxyapatite coatings substituted with 10% strontium produced anabolic effects on the periimplant bone, with significantly increased of BV / TV, Tb.Th and Tb.N and a significant decrease of Tb.Sp compared to the control group in which multi-substituted hydroxyapatite with silicon, magnesium and zinc was used. The groups containing 5%, 20% and 40% strontium or collagen were less effective, but they also produced significant changes in the micro-CT parameters, evaluated in comparison with the rats from the control group.

Conclusions. Multisubstituted hydroxyapatite with silicon, magnesium, zinc and strontium or collagen can facilitate osseointegration of the titanium-based implant by improving the surrounding bone microstructure, while 10% strontium coating showed the best properties on rat osseointegration.

GENERAL CONCLUSIONS

- Although total hip arthroplasty is a surgical procedure with excellent results, in most cases, a small proportion of complications and failures remain unavoidable. The main causes of primary hip arthroplasty revisions, which occur more than 10 years after primary intervention, are aseptic loosening, followed by osteolysis.
- There is a low negative correlation between BMI and the time interval between primary and revision arthroplasty. Consequently, weight loss would prolong the life of implants.
- Multisubstituted hydroxyapatite and collagen powder fits the model of hydroxyapatite structure, therefore the amount of substituted elements does not significantly affect the degree of crystallinity of hydroxyapatite, and the substituted elements in the hydroxyapatite molecule, HAP-1.5% Mg - 0.2% Zn 0.2% Si, are successfully incorporated.
- The HAPc composite was successfully deposited on the titanium surface, having a uniform porous structure, with self-assembled collagen fibers.
- HF-PEMF stimulation, applied from the first postoperative day, 10 minutes / day for two weeks, facilitates bone consolidation in rats, especially in the early stages of fracture healing.
- The concomitant use of HF-PEMF and the coating of titanium implants with HAPc promotes a synergistic effect on fracture healing, on an animal model.
- Intramedullary titanium nails coated with HAPc facilitate the osseointegration of titanium implants by improving the bone microstructure around them.
- Stimulation with HF-PEMF did not improve the osseointegration of titanium implants, proving to be effective only in facilitating the process of bone consolidation.

- Multisubstituted hydroxyapatite with silicon, magnesium, zinc and strontium or collagen can improve titanium-based implant osseointegration, while 10% strontium coating showed the best rat osseointegration properties.

Originality and innovative contributions of the thesis

- In Study 1, we retrospectively evaluated the main causes of revision of total primary hip arthroplasty in a regional center of Orthopedics and Traumatology. This study emphasizes the importance of this pathology and the technical and logistical difficulties that it raises, and even more, the impact on the patient with poorer results and a more difficult recovery. It also emphasizes the need to identify viable alternatives to existing materials that reduce the rate of complications and unsatisfactory results.
- In the first experimental study (Study 2), we evaluated, for the first time in the literature, two methods with the potential to facilitate bone consolidation. These are HF-PEMF and HAPc-coated titanium nails, used separately and combined. HF-PEMF stimulation, applied from the first postoperative day, 10 minutes / day for two weeks, facilitates bone consolidation in rats, especially in the early stages of fracture healing. Moreover, the concomitant use of HF-PEMF and HAPc coating of titanium implants promotes a synergistic effect on fracture healing in an animal model. This biomaterial based on multisubstituted hydroxyapatite and collagen in a polylactic acid matrix was developed in this research project, being first studied by qualitative analysis, in vitro and in vivo studies.
- In the second experimental study (Study 3), in the same animal model, we evaluated for the first time the osseointegration of titanium implants with biomimetic coatings based on multisubstituted hydroxyapatite and collagen, after stimulation with HF-PEMF. In the literature, these two processes, bone strengthening and osseointegration, are evaluated individually, but we evaluated the process of osseointegration in an animal model with femoral fracture, treated by two stimulation methods that have proven effective. Thus, we demonstrated that intramedullary titanium nails coated with HAPc facilitate the osseointegration of titanium implants by improving the bone microstructure around them, while stimulation with HF-PEMF used alone, did not improve the osseointegration of titanium implants.
- The osseointegration process was evaluated on another animal model, without fracture of the femur in which intramedullary nails based on titanium coated with hydroxyapatite multisubstituted with silicon, magnesium, zinc and collagen, respectively strontium in increasing percentages (5%, 10%, 20%, 40%) were introduced. Current results indicate that 10% strontium coating showed the best properties for implant osseointegration in rats.