
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Cercetări privind profilaxia defectelor osoase maxilare și terapia acestora prin utilizarea preparatelor pe bază de proteine morfogenetice osoase

Doctorand **Alexandru Bogdan-Cătălin**

Conducător de doctorat Prof.dr. **Monica Popa**



CUPRINS	12
ABREVIERI	
INTRODUCERE	13
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	15
1. Profilaxia generală și locală a defectelor osoase maxilare	17
1.1. Defectele osoase maxilare și elemente de profilaxie generală	17
1.2. Profilaxia primordială	18
1.3. Profilaxia primară sau post expunere	19
1.4. Profilaxia secundară	20
1.5. Profilaxia terțiară	20
2. Profilaxia locală a defectelor osoase maxilare	21
2.1. Profilaxia fracturilor osoase maxilare	21
2.2. Profilaxia parodontopatiei	23
2.2.1. Evaluarea parodontală	24
2.2.2. Chiuretajul parodontal	25
2.2.3. Imobilizările dento-dentare	25
2.2.4. Terapia fotodinamică	25
2.2.5. Terapia antiseptică și alternativă	25
3. Profilaxia defectelor osoase maxilare prin stimularea proliferării cu factori de creștere și BMP la nivel local	26
3.1. Bioreactivarea cu autoplasmă trombocitară	26
3.2. Bioreactivarea cu ajutorul undelor scurte pulsatile	28
3.2.1. Caracteristici ale undelor scurte pulsatile	28
3.2.2. Efectele biologice ale undelor scurte pulsatile	28
3.2.3. Indicații cu impact asupra structurilor osteo-ligamentare	29
3.2.4. Metodologia utilizării aparatului Diapulse	30
4. Tratamentul defectelor osoase maxilare prin utilizarea preparatelor pe bază de proteine morfogenetice osoase	31
4.1. Proteinele morfogenetice osoase și rolul lor terapia defectelor osoase maxilare	31
4.1.1. Modul de acțiune al BMP	31
4.1.2. Funcțiile BMP	31
4.2. Stimularea producerii BMP la nivel local	32
4.3. Tratamentul cu preparate pe bază de BMP utilizate în reconstrucția defectelor alveolare, fracturilor și despicăturilor	32
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	35
1. Ipoteza de lucru. Obiective	37
2. Metodologie generală	39
2.1. Studiile experimentale	39
2.2. Studiile clinice	42
3. Studiul 1. Inducția parodontopatiei marginale cronice la ovine - studiu experimental pilot	43
3.1. Introducere	43
3.2. Ipoteza de lucru. Obiective	44
3.3. Materiale și metode	45
3.4. Rezultate	47
3.5. Discuții	57
3.6. Concluzii	61
4. Studiul 2. Xenogrefele osoase bovine patentate cu atellocolagen tip1 combinate cu autoderivate sangvine, utilizate în sistem compozit în adiția osoasă alveolară - studiu experimental pe ovine	63
4.1. Introducere	63
4.2. Ipoteza de lucru. Obiective	64
4.3. Materiale și metode	65

4.4. Rezultate	69
4.5. Discuții	72
4.6. Concluzii	74
5. Studiul 3. Prezența BMP7 în cadrul biomaterialului de adiție osoasă realizat în sistem compozit	75
5.1. Introducere	75
5.2. Ipoteza de lucru. Obiective	75
5.3. Materiale și metode	76
5.4. Rezultate	79
5.5. Discuții	84
5.6. Concluzii	86
6. Studiul 4. Impactul mediului de proveniență, afecțiunilor sistemice, statusului socio-economic și al stilului de viață asupra integrității osoase maxilare și sistemului parodontal	87
6.1. Introducere	87
6.2. Ipoteza de lucru. Obiective	87
6.3. Materiale și metode	88
6.4. Rezultate	94
6.5. Discuții	101
6.6. Concluzii	103
7. Studiul 5. Utilizarea undelor scurte pulsatile în remineralizarea structurilor osoase alveolare maxilare la pacienții cu diabet zaharat	105
7.1. Introducere	105
7.2. Ipoteza de lucru. Obiective	106
7.3. Materiale și metode	107
7.4. Rezultate	117
7.5. Discuții	121
7.6. Concluzii	123
8. Concluzii generale	125
9. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	127
REFERINȚE	129
ANEXE	146

Cuvinte cheie: defecte osoase maxilare, parodontopatie cronică, proteine morfogenetice osoase, BMP7, xenogrefe osoase, unde scurte pulsatile, remineralizare

LISTA DE PUBLICAȚII

Articole publicate *in extenso* ca rezultat al cercetării doctorale

1. Alexandru Bogdan-Cătălin, Monica Popa. Complex oral rehabilitation in an elderly patient with periodontal disease who exercises regularly. *Palestrica of the third millennium Civilization and sport*, 2016; 17(2):134-139. *CNCSIS B+*. (studiul cuprins în capitolul 4).
2. Alexandru Bogdan-Cătălin, Popa Monica, Dogaru Gabriela, Constantin Anne-Marie, Georgiu Carmen, Șovrea Alina Simona. Pulsed short waves in the remineralization of alveolar bone structures of the jaw in patients with diabetes mellitus – a series of cases. *Balneo Research Journal*, 2019; 10(4):478-488. *ISI, Factor de impact - 0* (studiul cuprins în capitolul 5)
3. Bogdan-Cătălin Alexandru, Monica Popa, Cosmin Peștean, Robert Purdoiu, Liviu Oana, Anne-Marie Constantin, Ramona Amina Popovici, Alina Simona Șovrea, Carmen Georgiu, Gabriela Dogaru. The Effect of Type 1 Atelocollagen in Association with Blood Self-derivatives in Alveolar Bone Augmentation. *Rev. Chim*, 2020;71(4): 390-400. *ISI, Factor de impact - 1,34* (studiul cuprins în capitolul 2).
4. Alexandru Bogdan-Cătălin, Monica Popa, Liviu Oana, Carmen Georgiu, Flaviu Tabaran, Adrian Macri, Purdoiu Robert, Dan Istrate, Gabriela Dogaru, Camelia Lazăr, Bosca Bianca, Cosmin Peștean, Anne-Marie Constantin, Șovrea Alina. Induction of chronic marginal periodontitis in an experimental sheep model: clinical, radiological and histological evaluation. *Rom Biotechnol Lett*. 2020; 25(3): 1511-1525. *ISI, Factor de impact - 0,619*, (studiul cuprins în capitolul 1).

INTRODUCERE

Prezentul studiu evidențiază etiologia plurifactorială a defectelor osoase maxilare, abordând în special problemele cele mai evidente și anume rezorbția osoasă alveolară din cadrul afecțiunilor parodontale, care poate reprezenta atât consecința unor boli sistemice, cât și a unor tratamente medicamentoase sau, în cele mai multe cazuri, poate fi cauzată de factorii locali determinați de stilul de viață al indivizilor (tradus prin igiena oro-dentară, alimentație, obiceiuri vicioase, inclusiv existența sau inexistența activităților fizice). În același timp trebuie ținut cont și de factorii iatrogeni, reprezentați de piesele protetice conjuncte supraconturate, piesele protetice adjuncte care nu sunt adaptate conform cerințelor specifice câmpurilor protetice, obturațiile de colet supraconturate etc. Toate aceste aspecte favorizează rezorbția osoase alveolare și, respectiv, atrofii osoase.

În literatura științifică s-au raportat defecte osoase prezente la nivelul a aproximativ 20% din dinți, cel mai adesea bilateral vestibular (1). Traumele ocluzale pot conduce în timp la dezvoltarea unor defecte osoase la nivelul proceselor alveolare, mai ales atunci când există corticale osoase subțiri (3).

Profilaxia primordială cu impact asupra defectelor osoase maxilare, se referă la factorii sociali și de mediu cu potențial de relaxare sau stres, care includ (17): stilul de viață, educația, accesul la serviciile medicale, influența anturajului individului, posibilitatea abordării serviciilor medicale, posibilitatea evitării agresiunilor inter-umane.

Profilaxia primară sau post expunere include factorii etiologici și factorii de risc, având în vedere și protejarea populației vulnerabile (17), care de cele mai multe ori necesită ajutor, inclusiv consiliere psiho-socială în ceea ce privește adresabilitatea către serviciile medicale și respectiv către autorități.

Profilaxia secundară are ca scop reducerea prevalenței bolii printr-o descoperire timpurie, într-o etapă asimptomatică și prin introducerea unui tratament adecvat. Se aplică prin teste de screening sau activități de consiliere (17).

Profilaxia terțiară include măsurile curative necesare pentru reducerea dezvoltării bolii și prevenirea complicațiilor, pentru a preveni evoluția și respectiv reactivitățile (22, 23, 24).

Profilaxia locală a defectelor osoase maxilare se poate realiza prin profilaxia și prevenția fracturilor osoase maxilare (37), a anomaliilor congenitale și a afecțiunilor parodontale (stil de viață adecvat, igiena oro-dentară corectă, prezentarea pacienților la consultul stomatologic periodic, tratarea edentațiilor, evitarea și/sau corectarea iatrogenilor din cadrul tratamentelor odontale, protetice, endodontice (42), examinări imagistice periodice). Este realizată și prin stimularea proliferării factorilor de creștere inclusiv a BMPs la nivel local prin:

1. Bioreactivarea cu autoplasmă trombocitară se adresează în general îmbolnăvirilor parodontale distrofice de tip involutiv, dar și pentru completarea terapiei parodontale în vederea îmbunătățirii rezultatelor (60).

2. Bioreactivarea cu ajutorul undelor scurte pulsatile care prezintă efectele constatate pe verigi fiziopatologice cu implicare asupra structurii osoase a maxilarelor și a întregului ansamblu parodontal cu rol de eliminare a stărilor de depolarizare reziduală, cu refacerea polarității membranare fiziologice de repaus (69), stimularea activităților celulare locale, stimularea producerii depozitelor de colagen și fibrină, regenerarea tisulară (270) deține efecte de ameliorare evidentă a osteoporozelor.

3. Adiția defectelor osoase maxilare se poate realiza prin utilizarea preparatelor pe bază de proteine morfogenetice osoase, cu rol de inducție și respectiv de conducție a BMPs la nivel local, în procesul de formare a osului și cartilajului (83). Utilizarea BMP-urilor umane recombinante este promițătoare în facilitarea regenerării osoase și a vindecării intervenției după implantul dentar (98, 106, 107), în corectarea chirurgicală a defectelor intraosoase, supra-alveolare, de furcație și fenestrare (108, 109).

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

1. Ipoteza de lucru. Obiective

Studiile experimentale au fost direcționate către defectele osoase induse de parodontopatia marginală cronică, deoarece acestea sunt cele mai frecvente în practica clinică. Parodontopatia marginală cronică a fost cel mai ușor de indus în studiul pe animal de talie mare, evitând producerea suferinței animalelor.

Pe lângă inducerea bolii, studiile experimentale terapeutice au urmărit evaluarea eficienței regenerării osoase alveolare ghidate, în cadrul adiției osoase realizată în sistem compozit cu os bovin liofilizat patentat cu atellocolagen tip 1 combinat cu autoderivate sangvine și, respectiv, evaluarea prezenței BMP7 la șase săptămâni post operator.

Studiile clinice au urmărit evidențierea statistică a efectelor pozitive ale măsurilor de profilaxie generală direcționate asupra factorilor care țin de stilul de viață și care pot afecta integritatea structurilor osoase maxilare. Am urmărit, de asemenea, demonstrarea impactului distructiv asupra structurilor osoase alveolare maxilare provocat de sedentarism, de alimentația necorespunzătoare și de prezența factorilor iritativi locali la nivelul parodontiului marginal. De asemenea, în scop terapeutic, am urmărit potențialul electro-fizio-terapiei în regenerarea structurilor osoase

alveolare maxilare. Efectele pozitive, biotrofice ale acestei terapii, reprezentate de normalizarea activității ATP-azice, refacerea activității membranare de repaus și stimularea producerii depozitelor de colagen și fibrină care determină, stratificarea colagenului și stimularea ulterioară a osteogenezei.

2. Metodologie generală

Studiile experimentale s-au realizat în baza acordului Comisiei de Etică nr. 23 din 23.01.2015 din cadrul U.M.F. Iuliu Hațieganu Cluj-Napoca. În studiu s-au inclus cinci ovine *Ovis Aries* (rasa Țurcană Românească), în vârstă de cinci ani, femele nongestante. S-a realizat un model experimental animal și preparate histologice în diferite colorații (hematoxină și eozină (H&E), PAS, Giemsa, Gram, analiză imunohistochimică.

Studiile clinice: studiul clinico-statistic evaluează impactul stilului de viață asupra integrității osoase maxilare, impactul afecțiunilor care favorizează apariția defectelor osoase maxilare, pe o perioadă de șapte ani, în cadrul Spitalului clinic Județean de Urgență Cluj. Studiul clinico-terapeutic a urmărit evaluarea radiologică și clinică a rezultatelor electro-fizio-terapii și posibilitatea introducerii acestei metode în cadrul terapiilor de regenerare osoasă.

3. Studiul 1. Inducția parodontopatiei marginale cronice la ovine - studiu experimental pilot

3.1. Introducere

Parodontopatia marginală cronică (CPD) este o boală imunoinflamatorie persistentă, cu impact marcat asupra țesuturilor de susținere a dinților (119), extrem de complexă și multifactorială, cu o clasificare dificilă și controversată. CPD include un spectru larg de afecțiuni și prezintă numeroase tipuri; poate fi localizată sau generalizată și poate fi clasificată suplimentar în funcție de întinderea, de severitatea acesteia, dar și de asocierea cu factorii de risc și bolile sistemice (120). CPD afectează predominant adulții (121) și reprezintă una dintre cauzele principale ale edentațiilor la pacienții de peste 40 de ani (122).

Ovinele prezintă predispoziție naturală către parodontopatie, afecțiunea fiind numită și "gura spartă", afecțiune care conform studiilor microbiologice conține atât bacterii regăsite și în parodontopatia umană manifestă clinic. De asemenea, ovinele prezintă o anizotropie osoasă foarte asemănătoare cu cea umană (139, 140), aspect cu impact major asupra statusului parodontal.

3.2. Ipoteza de lucru. Obiective

Ipoteza de lucru - am folosit ca ipoteză de lucru identificarea factorilor de mediu și factorilor locali regăsiți frecvent și în patologia umană, cu rol patogen în procesul de dezvoltare a bolii parodontale. Am considerat ca potențiali factori patogeni pentru inducerea CPD: sedentarismul, aportul alimentar inadecvat și instilarea exudatului parodontal colectat de la pacienții cu parodontopatie marginală cronică, urmată de iritația cronică a parodontiului marginal, pentru o perioadă lungă de timp.

Obiective - am urmărit definirea unei noi tehnici experimentale de inducere a parodontopatiei marginale cronice, similare formelor umane, pe modelul experimental ovin, având în vedere debutul și evoluția naturală a bolii la ovine.

3.3. Materiale și metode

Pentru realizarea unui diagnostic corect al statusului parodontal corespunzător speciei s-au evaluat animale din lotul martor și experimental, prin examinare radiologică, parodontometrie inițială realizată strict la nivelul dinților frontali mandibulari. S-a intervenit local asupra parodontiului marginal și s-au aplicat condiții stricte de dietă și de mediu.

Analiza statistică a utilizat testul T pentru probele perechi și pentru eșantioane independente cu variabile inegale, după egalitatea variabilelor testate anterior s-a folosit testul F.

3.4. Rezultate

De-a lungul perioadei de inducție a bolii, realizată în decursul a zece luni, după evaluarea inițială și intervenția chirurgicală locală, urmată de administrarea rației alimentare și cazarea într-un spațiu care nu le-a permis animalelor deplasări ample, au fost observate următoarele modificări: recesiune gingivală, prezența sângerării la sondare, diferențe de profunzime la sondarea parodontală și exfolierea unor dinți, fără a fi asociate tare organice sau scăderi în greutate. Animalele au fost reexamine după o perioadă de zece luni.

Creșterile atât ale profunzimii la sondarea parodontală, cât și ale mobilității dentare au fost cuantificate statistic și s-au obținut diferențe majore la nivelul celor șase puncte de referință, cu rezultate înalt semnificative statistic.

Prin evaluarea radiologică, la sfârșitul experimentului, au fost observate demineralizarea septurilor interdentare și alte modificări: septul osos redus în volum cu resorbție osoasă, un spațiu desmodontal extins și mai profund; depuneri de tartru sub joncțiunea smalț-ciment, lărgirea spațiului desmodontal după inducerea bolii; demineralizare osoasă după inducerea bolii.

Evaluarea morfopatologică a evidențiat un aspect microscopic de distrugere parodontală, cu multiple modificări histopatologice: reacții inflamatorii, resorbție osoasă, resorbție cemento-dentinară, distrucții ale ligamentelor dento-parodontale, chiar și prezența unor specii bacteriene regăsite în colorații histologice speciale. În colorațiile cu

hematoxină-eozină s-au observat reacțiile inflamatorii și distrucțiile tisulare, iar în colorațiile PAS, Giemsa și respectiv Gram s-au observat coloniile bacteriene.

3.6. Concluzii

1. Menținerea unui suport parodontal sănătos are un impact pozitiv asupra imunității gazdei și poate reprezenta un factor de prevenție pentru alte afecțiuni inflamatorii sistemice.

2. Controlul plăcii bacteriene, îndepărtarea calculilor și a tuturor factorilor iritativi locali cu acțiune asupra parodontiului marginal sunt esențiale în stoparea gingivitei, pierderii atașamentului parodontal și în cele din urmă a dinților.

3. Dezechilibrele dietetice cu scăderea absorbției calciului pot favoriza inducerea bolii parodontale. O dietă săracă în carbohidrați și bogată în acizi grași Omega-3 și vitaminele C și D poate reduce semnificativ inflamațiile gingivo-parodontale.

4. Modelul experimental ovin pentru boala parodontală are multe asemănări cu condiția umană și ar putea permite un studiu mai rapid al unor metode terapeutice.

5. Chiar dacă se impun efective mai mari de animale pentru realizarea unei clasificări în ceea ce privește mobilitatea dentară fiziologică și profunzimea fiziologică la sondare, parodontopatia naturală la ovine reprezintă un argument important pentru utilizarea oilor ca model experimental pentru boala parodontală cronică.

6. Realizarea unor studii mai aprofundate și extinse cu măsurători obiective ale markerilor serologici ai bolii parodontale ar putea fi utilă pentru confirmarea importanței acestui model animal.

4. Studiul 2. Xenogrefele osoase bovine patentate cu atelocolagen tip1 combinate cu autoderivate sangvine, utilizate în sistem compozit în adiția osoasă alveolară – studiu experimental pe ovine

4.1. Introducere

Xenogrefele de origine bovină pot fi considerate echivalentul autogrefelor (179), în cadrul acestor xenogrefe producându-se remodelarea fiziologică osteoclastică și respectiv osteoblastică (179), grefa fiind minim resorbită în perioada de vindecare (180). În acest studiu s-a utilizat varianta de xenogrefă bovină cu structură macroporoasă, îmbogățită cu atelocolagen tip I. Structurile macroporoase sunt ideale în osteoconducție favorizând proliferarea vasculară în interiorul masei de adiție, iar atelocolagenul stimulează agregarea trombocitară și favorizează eliberarea peptidelor de creștere responsabile pentru osteoconducție.

4.2. Ipoteza de lucru. Obiective

Animalele alese pentru studiul experimental au fost ovinele, care au fost utilizate în multe studii din diverse domenii de cercetare stomatologică: vindecarea plăgilor parodontale (168), regenerarea endodontică (194), terapia cu celule stem în regenerarea osoasă (170), studii de implantologie (171). Mai multe studii au raportat asemănări între microflora parodontală ovină și cea umană: *Treponema* (137), *Bacteroides melanogenicus* / *Prevotella* (173, 178), *Bacteroides gingivalis* (172) pot fi prezente la ambele specii. Prin urmare, această colonizare bacteriană, alături de evoluția naturală a bolii parodontale și anizotropia osoasă la ovine, reprezintă argumentele principale pentru utilizarea modelului experimental ovin.

Am urmărit atât capacitatea de regenerare osoasă alveolară ghidată la ovine, prin utilizarea în sistem compozit a preparatului de xenogrefă bovină patentată cu atelocolagen tip 1 în combinație cu PRP (autoplasmă trombocitară) și, respectiv, A-PRF (cheag de fibrină cu proprietăți avansate) utilizat pe post de membrană, cât și eficiența acestui preparat în regenerarea osoasă alveolară, în contextul prezenței parodontopatiei marginale cronice.

4.3. Materiale și metode

S-au utilizat trei ovine *ovis aries* (rasa Țurcană Românească), în vârstă de cinci ani, femele nongestante, multipare, având greutatea cuprinsă între 40-60 kg, fără afecțiuni cardiace sau alte tare organice, care prezentau parodontopatie marginală cronică, și care au beneficiat de tratamente parodontale, inclusiv adiție osoasă.

S-a realizat evaluarea statusului parodontal (41) și a profunzimii la sondare. Tratamentul realizat a inclus antibioterapia, detartrajul supragingival și chiuretajul parodontal. Adiția osoasă a proceselor alveolare maxilare asociată ansamblului parodontal a inclus os bovin liofilizat și autoplasmă trombocitară, după o tehnică operatorie adaptată.

4.4. Rezultate

Evaluarea rezultatelor din punct de vedere histologic s-a realizat la șase săptămâni post operator. Biomaterialul s-a transformat parțial, în zonă hipercelulară, cartilaj, structură osoasă și ligamente parodontale. Fenomenele de „transformare” a biomaterialului în os încep în profunzime, în locul de contact cu țesuturile mezenchimale ale gazdei, osificarea fibro-cartilaginoasă înlocuind și utilizând treptat materialul dinspre periferie spre centrul acestuia, asemănător unei fibroze cicatriciale/calus. Într-un moment intermediar al acestui proces se pot observa concomitent

biomaterialul, numeroase celule mezenchimale nediferențiate (mici, cu citoplasmă redusă, nucleu mic, bazofil), imediat adiacente biomaterialului, în jur fibroblaste secretante de fibre de colagen, iar la periferie, în contact direct cu țesutul gazdă (în cazul de față osul alveolar, desmodontul sau fibromucoasa gingivală) fibrocartilaj, cartilaj și respectiv os nou. Osul nou prezentând incluziuni de biomaterial hiper celular.

4.6. Concluzii

1. Adiția osoasă alveolară realizată cu xenogrefă bovină îmbunătățită cu atelocolagen tip 1 și combinată cu PRP și, respectiv, A-PRF sub formă de membrană a oferit rezultate pozitive după evaluarea realizată la șase săptămâni post intervenție.

2. Biomaterialul utilizat asigură o regenerare osoasă alveolară foarte bună, cu scăderea reacțiilor postoperatorii și fără a prezenta efecte adverse.

5. Studiul 3. Prezența BMP7 în cadrul biomaterialului de adiție osoasă realizat în sistem compozit

5.1. Introducere

În ultimii ani, o importanță deosebită a fost acordată biomaterialelor utilizate în regenerarea osoasă alveolară ghidată, xenogrefele bovine regăsindu-se printre biomaterialele de elecție. Cele mai bune rezultate în regenerările tisulate ghidate (RTG) osoase sunt oferite de autogrefele osoase și, respectiv, de biomaterialele ce conțin factori de creștere recombinanți. BMP-7, care aparține familiei TGF- β , are un rol principal în transformarea celulelor stem mezenchimale în os și cartilaj și se regăsește cu preponderență în autoderivatele sangvine (182).

5.2. Ipoteza de lucru. Obiective

BMP-7 intervine în diferențierea osteoblastică și se regăsește cu preponderență în autoderivatele sangvine (182).

Scopul prezentului studiu experimental este reprezentat de evaluarea adiției osoase alveolare, realizată în sistem compozit, pe ovine, în cadrul tratamentelor parodontopatiilor marginale cronice, cu xenogrefe bovine patentate cu atelocolagen tip1, combinate cu PRP și acoperite cu membrane confecționate din A-PRF și, respectiv, de evidențierea și evaluarea proteinei morfogenetice osoase diviziunea șapte (BMP-7) în cadrul zonelor de adiție osoasă, după o perioadă de șase săptămâni post intervențional.

5.3. Material și metodă

În acest studiu experimental au fost incluse trei ovine *ovis aries* (rasa Țurcană Românească), în vârstă de cinci ani, femele nongestante, multipare, având greutatea cuprinsă între 40-60 kg, fără afecțiuni cardiace sau alte tare organice, care prezentau parodontopatie marginală cronică și care au beneficiat de tratamente parodontale, inclusiv de adiție osoasă.

După diagnosticarea parodontopatiei marginale cronice, realizarea tratamentelor profilactice și a chiuretajelor parodontale în câmp închis, s-a realizat adiția osoasă alveolară în sistem compozit.

Expresia cantitativă și calitativă a BMP7 a fost urmărită la nivelul parametrilor markeri ai regenerării parodontale.

Scorul de adiție osoasă a fost determinat de însumarea scorurilor a 12 categorii. Categoriile au fost stabilite în funcție de prezența a: ligamentelor desmodontale, biomaterial, biomaterial celular, cartilaj, cartilaj+biomaterial, os nou, os nou+biomaterial, mucoasă, cement, cement celular, osteocite, osteoblaste. Elementele analizate au fost alese în funcție de caracteristicile țesuturilor parodontale regăsite în cursul procesului de diferențiere, tehnica fiind asemănătoare cu cea din alte studii similare (220).

Analiza statistică a fost realizată folosind testul Mann Whitney. Relația dintre parametrii analizați a fost apreciată cu coeficientul de corelație Pearson în cazul datelor fără dispersie și cu coeficientul de corelație Spearman în cazul datelor cu dispersie. O valoare p mai mică de 0,05 a fost considerată semnificativă statistic. Analiza statistică a fost efectuată cu SPSS 25 și Microsoft Excel.

5.4. Rezultate

La lotul I (lotul de control) examenul histologic H-E a evidențiat prezența inflamației, distrucției ligamentelor parodontale, depozitelor tartrice, plăcii bacteriene și corpi străini de la nivelul spațiului desmodontal. În lotul de control cu parodontopatie marginală cronică, BMP7 s-a evidențiat la nivelul osteoblastelor și osteocitelor. La lotul II (lotul expus-tratat) s-a realizat evaluarea histologică pe baza colorației H-E. Iunohistochimia a evidențiat, la șase săptămâni, prezența BMP7 la nivelul biomaterialului, desmodonțiului, osteocitelor, osteoblastelor și în apropierea fibroblastelor, condrocitelor, osului nou format. Cea mai mare intensitate a colorației s-a observat la nivelul biomaterialului, în care, în timp ce se transformă, intensitatea colorației se reduce o dată cu creșterea celularității și cu transformările acestuia, apărând clar incluziunile de biomaterial colorat specific BMP7, atât la nivelul osului în curs de formare, cât și la nivelul fibroblastelor.

Din punct de vedere statistic, între lotul I și II au existat diferențe semnificative între: ligamente, biomaterial, biomaterial celular, cartilaj, cartilaj cu biomaterial și os nou. Dezvoltarea ansamblului paradontal a fost mult mai semnificativă statistic la lotul II, unde s-au înregistrat mai multe corelații statistice.

5.6. Concluzii

1. Rezultatele acestui studiu *in vivo* arată o capacitate foarte bună a biomaterialului studiat de a induce diferențierea țesuturilor osteo-parodontale.

2. Componentele grefei realizată în sistem compozit (celule osteogene, factori osteoconductivi, matrice osteoconductoare poroasă și factorii de creștere cu eliberare secvențială din autoderivatele sangvine, inclusiv BMP7) asigură condițiile optime necesare regenerării osoase alveolare.

3. Autoplasma trombocitară este mai eficientă dacă se utilizează eprubetele cu adaos de heparină, care leagă factorii de creștere, inclusiv BMP7.

4. Cele mai semnificative statistic efecte ale xenogrefei realizate în sistem compozit au fost inducerea diferențierii celulare în osteoblaste și formarea osului nou.

6. Studiul 4. Impactul mediului de proveniență, afecțiunilor sistemice, statusului socio-economic și al stilului de viață asupra integrității osoase maxilare și sistemului parodontal

6.1. Introducere

Toate formele de parodontopatie - traumatismele, parodontitele acute sau cronice, bruxismul, involuția osoasă datorată senescenței, rezechțiile tumorale de la nivelul maxilarelor – reprezintă o patologie frecvent întâlnită în serviciile de medicină dentară.

Predispoziția la anumite afecțiuni osteo-parodontale crește în timp, datorită acumulării efectelor patogene ale diferitelor afecțiuni cronice (247). Excluderea obiceiurilor vicioase cu impact negativ asupra maxilarelor și respectiv asupra parodontiului, alături de realizarea unei reabilitări orale individualizate îmbunătățesc semnificativ șansele menținerii unui status dento-osteo-parodontal optim pentru perioade îndelungate (41, 248, 249).

6.2. Ipoteza de lucru. Obiective

Respectarea elementelor de geriatric stomatologică, respectarea etapelor de tratament parodontal și protetic, însoțite de complianța pacienților, pot oferi rezultate pozitive legate de creșterea calității vieții pentru perioade lungi de timp.

Datele obținute din cadrul S.P.C.J.U-CJ prin înregistrarea populației care s-a adresat în vederea realizării tratamentelor stomatologice curente sau în regim de urgență au oferit o imagine cuprinzătoare asupra rezultatelor oferite în cadrul etapelor de tratament parodontal și protetic.

Studiul clinic realizat în cadrul cabinetului particular de stomatologie pe o selecție de pacienți geriatrici poate evidenția relația dintre involuția parodontală datorată senescenței la pacienții vârstnici și aspecte ale stilului de viață, care includ igiena orală individualizată, exercițiile fizice cu intensitate moderată, realizarea periodică a procedurilor balneoclimaterice și adoptarea unei diete bogate în antioxidanți.

6.3. Material și metodă

Colectarea datelor

S-a realizat un studiu retrospectiv pentru o perioadă de 7 ani, la nivelul populației care s-a adresat Cabinetelor Stomatologice din cadrul Spitalului Clinic Județean de Urgență Cluj.

Pentru analiza statistică datele au fost prezentate sub formă de frecvențe relative. Trendul pe ani a fost analizat cu ajutorul regresiei liniare univariate, cu ajutorul aplicației Microsoft Excel. A fost calculată semnificația statistică a trendului. P semnificativ a fost considerat sub 0.05.

Morbiditatea s-a analizat pentru anii 2015-2019 și s-au evaluat afecțiunile gingiei și crestei alveolare edentate, pentru care s-a utilizat analiza prin regresie liniară univariată, pe categorii de vârstă, pentru o perioadă de cinci ani.

Caz clinic

În studiul de față am prezentat statusul osos maxilar în cazul unei paciente în vârstă de 78 de ani, care a practicat un stil de viață sănătos, conform descrierilor de mai sus. S-au prezentat date legate de *anamneză*, testele aplicate, diagnosticul protetic, diagnosticul parodontal, planul de tratament.

6.4. Rezultate

Au fost prezentate rezultate legate de: activitățile profilactice în comparație cu totalul altor tratamente între anii 2013 - 2019 și trendul acestora, tratamentele nefinalizate în comparație cu restul tratamentelor între anii 2013 - 2019 și trendul acestora, ședințele de detartraj în comparație cu restul tratamentelor între anii 2013 - 2019 și trendul acestora, extracțiile dentare în comparație cu restul afecțiunilor între anii 2013 - 2019 și trendul acestora, morbiditatea pe afecțiuni ale gingiei și crestei alveolare osoase edentate și alte boli ale maxilarelor în comparație cu restul afecțiunilor

între anii 2015 - 2019 și trendul acestora, morbiditatea pe afecțiuni ale gingiei și crestei osoase edentate și pentru alte boli ale maxilarelor în comparație cu restul afecțiunilor între anii 2015 - 2019 și trendul acestora la grupa de vârstă 0-14 ani, morbiditatea pe afecțiuni ale gingiei și crestei osoase edentate și alte boli ale maxilarelor în comparație cu restul afecțiunilor între anii 2015 - 2019 și trendul acestora la grupa de vârstă 15-64 ani, morbiditățile pentru afecțiuni ale gingiei și crestei osoase edentate și alte boli ale maxilarelor în comparație cu restul afecțiunilor între anii 2015 - 2019 și trendul acestora la grupa de vârstă 65 ani și peste. A fost prezentată activitatea medicală a cabinetului de stomatologie din cadrul UPU între anii 2013 - 2014.

Cazul clinic prezentat a arătat că involuția parodontală de senescență se poate instala în limite funcționale (lipsa inflamației și a mobilității dentare), în contextul unui stil de viață sănătos, care include: practicarea regulată a exercițiilor fizice, menținerea unei igiene orale individualizate prin utilizarea mijloacelor auxiliare de igienă, aportul constant de antioxidanți etc.

6.6. Concluzii

1. Activitățile profilactice (inclusiv ședințele de detartraj) și numărul procedurilor nefinalizate au prezentat trenduri de evoluție descrescătoare, la toate grupele de vârstă.

2. Afecțiunile gingiei și ale crestei osoase edentate au prezentat un trend de evoluție crescător, semnificativ statistic, cu o dublare anuală, la grupa de vârstă 15-64 ani, evidențiind cel mai bine impactul statusului socio-economic.

3. La vârstnici, starea generală de sănătate orală s-a agravat, a crescut semnificativ prevalența tuturor tipurilor de afecțiuni, inclusiv a afecțiunilor gingiei și crestei osoase edentate.

4. Păstrarea spațiului biologic al parodontiului marginal, prin poziționarea corectă a limitelor P.P.F și a marginilor protezei parțiale mobilizabile, precum și plasarea corectă a punctelor de contact permit menținerea unui parodonțiu sănătos.

5. Stilul de viață (dieta bogată în antioxidanți, exercițiile fizice regulate, procedurile balneoclimatice, evitarea obiceiurilor vicioase, igiena adecvată) îmbunătățește semnificativ șansele pacientului pentru un prognostic parodontal favorabil.

6. În ceea ce privește cazul clinic, oferirea unui sprijin suplimentar prin imobilizarea dinților cu involuție parodontală senescentă (PPF metalo-ceramic) asigură un suport parodontal mult mai puternic pentru un plan de tratament protetic în sistem compozit.

7. Tratamentele endodontice la pacienții cu involuție parodontală senescentă au impact asupra structurilor parodontale, având în vedere vascularizația de tip terminal a dinților.

7. Studiul 5. Utilizarea undelor scurte pulsatile în remineralizarea structurilor osoase alveolare maxilare la pacienții cu diabet zaharat

7.1. Introducere

Rezorbția și demineralizarea structurilor osoase alveolare maxilare, în prezența dinților, este frecvent întâlnită în cadrul ambulatoriilor de stomatologie și este asociată afecțiunilor parodontale, care se pot prezenta sub forme: agresive, cronice, necrotice și abcese parodontale (41).

Aplicarea undelor scurte pulsatile este benefică pentru celule, stimulând eliberarea unor cantități sporite de energie, necesare proceselor reparatorii și intensificând regenerarea osoasă alveolară.

7.2. Ipoteza de lucru. Obiective

Studiul de față și-a propus evidențierea remineralizării și regenerării țesutului osos alveolar, în lipsa asocierii tratamentului de adicție osoasă.

Obiectivele acestui studiu s-au concretizat în raportul de caz a trei paciente, cu vârste cuprinse între 50 și 78 de ani, care prezentau parodontopatie marginală cronică și diabet zaharat tip II și care au beneficiat de proceduri cu unde scurte pulsatile.

7.3. Materiale și metode

Studiul a fost realizat în baza acordului Comisiei de Etică avizat de Universitatea de Medicină și Farmacie Iuliu Hațieganu Cluj-Napoca și al acordului informat al subiectului.

În perioada 2015-2017 pacientele s-au prezentat în cadrul cabinetului particular de medicină dentară, prezentând necesități de reabilitări orale complexe, fiind prezente mai multe afecțiuni stomatologice, inclusiv parodontopatia marginală cronică în contextul existenței diabetului zaharat tip II.

Am prezentat date legate de: anamneze, testele aplicate, diagnosticul odontal, endodontic și parodontal, tratamentele odontale, endodontice, chirurgicale și parodontale și respectiv terapia cu unde scurte pulsatile.

7.4. Rezultate

Remineralizarea structurii osoase alveolare după introducerea terapiei cu unde scurte pulsatile s-a produs vizibil la toate cele trei cazuri incluse în studiu, într-un timp scurt, rezultatele fiind peste așteptări. Sunt vizibile radiologic regenerările osoase în jurul dinților, care au beneficiat de chiuretaje parodontale în câmp închis. Conturul defectelor osoase existente din jurul dinților a prezentat o tendință de reorientare a trabeculelor osoase către rădăcinile dinților după completarea tratamentelor cu unde scurte pulsatile. În alte zone dentare, în care defectele osoase au fost verticale, s-a constatat densitatea osoasă mai crescută în jurul rădăcinilor și volumul osos mărit chiar și în sens vertical.

Primul caz a prezentat remineralizarea structurii osoase alveolare mult mai intens comparativ cu remineralizarea structurii osoase din zona breșelor edentate. În al 2-lea caz, s-a înregistrat remineralizarea avansată a structurilor osoase alveolare maxilară și, respectiv, mandibulară, după opt săptămâni de la debutul terapiei cu unde scurte pulsatile și de la realizarea chiuretajelor în câmp închis.

În al 3-lea caz după trei săptămâni de la debutul terapiei cu unde scurte pulsatile s-a constatat remineralizarea structurilor osoase alveolare, cele mai remarcabile regenerări osoase fiind procesele alveolare de la nivelul dinților. Reexaminarea radiologică realizată după trei ani de la finalizarea tratamentelor a constatat menținerea volumului osos în condițiile respectării recomandărilor preventiv-profilactice, cu persistența structurilor osoase alveolare marginale, a septurilor osoase interdentare și apicale complet mineralizate.

7.6. Concluzii

1. Rezultatele terapiei cu unde scurte pulsatile se pot menține perioade lungi de timp, cu condiția respectării igienei oro-dentare.

2. Protocolul cu unde scurte pulsatile în tratamentul pierderii osoase alveolare la pacienții diabetici reprezintă o alternativă mai puțin invazivă, comparativ cu chirurgia parodontală cu lambou, chiar și în cazurile în care există pierderi osoase agresive.

3. Undele scurte pulsatile reprezintă o metodă de terapie neinvazivă, care asigură obținerea unei regenerări osoase alveolare într-un timp relativ scurt.

8. Concluzii generale

1. Modelul experimental ovin, prin prezența parodontopatiei naturale, are asemănări importante cu condiția umană și ar putea permite un studiu mai rapid al modelelor terapeutice.

2. Realizarea unor studii mai extinse, cu determinarea markerilor serologici ai bolii parodontale poate fi utilă pentru confirmarea importanței modelului animal.

3. Adiția osoasă a proceselor alveolare maxilare realizată cu xenogrefă bovină (patentată cu atelocolagen tip 1) în sistem compozit în combinație cu PRP și A-PRF (pe post de membrană) a oferit rezultate terapeutice foarte bune la șase săptămâni post operator.

4. Biomaterialul utilizat în sistem compozit este bine tolerat și nu a cauzat complicații și fenomene de respingere.

5. Prin conținutul de elemente osteogene (celule, factori osteoconductivi, matrice osteoconductoare poroasă) și prin eliberarea secvențială a factorilor de creștere (BMPs din autoderivatele sangvine), biomaterialul utilizat în sistem compozit asigură condițiile optime necesare regenerării osoase alveolare și o eficiență terapeutică ridicată.

6. Biomaterialul utilizat în sistem compozit și-a dovedit eficiența prin proprietatea acestuia de a lega factorii de creștere și inclusiv BMP7.

7. Scăderea aplicării măsurilor de profilaxie a determinat creșterea semnificativă statistic a frecvenței afecțiunilor gingiei și ale crestei alveolare edentate la grupa de vârstă 15-64 ani, evidențiind cel mai bine impactul statusului socio-economic, iar la vârstnici a crescut semnificativ prevalența tuturor tipurilor de afecțiuni.

8. Factorii legați de stilul de viață a pacienților (dieta, exercițiile fizice, evitarea obiceiurilor vicioase, igiena riguroasă) asigură menținerea unui suport osteo-parodontal sănătos și reprezintă factori de prevenție pentru apariția bolii parodontale.

9. Controlul plăcii bacteriene, îndepărtarea calculilor, și a tuturor factorilor iritativi locali cu acțiune asupra parodonțiului marginal sunt esențiale în prevenirea pierderii de atașament parodontal și în cele din urmă a dinților.

10. Imobilizarea dinților cu involuție parodontală de senescență, printr-o P.P.F. poziționată corect, cu păstrarea spațiului biologic al parodonțiului marginal asigură un suport parodontal mult mai puternic pentru un tratament restaurativ.

11. Terapia cu unde scurte pulsatile în rezorbția osoasă alveolară reprezintă o alternativă mai puțin invazivă, comparativ cu chirurgia parodontală, chiar și în cazurile cu pierderi osoase semnificative în condițiile existenței diabetului zaharat.

12. Undele scurte pulsatile reprezintă o metodă de terapie eficientă, cu rezultate care se pot menține perioade lungi de timp, cu condiția realizării unei igiene oro-dentare corecte, dispensării constante din punct de vedere stomatologic cât și din punct de vedere a afecțiunilor generale asociate (ex. cazurile pacienților diabetici).

ABSTRACT OF THE DOCTORAL THESIS

Studies on the prophylaxis of maxillary bone defects and their therapy by using bone morphogenetic protein preparations

Doctoral candidate **Alexandru Bogdan-Cătălin**

Doctoral supervisor Prof. Dr. **Monica Popa**



CONTENTS	12
ABBREVIATIONS	
INTRODUCTION	13
CURRENT STAGE OF KNOWLEDGE	15
1. General and local prophylaxis of maxillary bone defects	17
1.1. Maxillary bone defects and elements of general prophylaxis	17
1.2. Primordial prophylaxis	18
1.3. Primary or post-exposure prophylaxis	19
1.4. Secondary prophylaxis	20
1.5. Tertiary prophylaxis	20
2. Local prophylaxis of maxillary bone defects	21
2.1. Prophylaxis of maxillary bone fractures	21
2.2. Prophylaxis of periodontal disease	23
2.2.1. Periodontal evaluation	24
2.2.2. Periodontal curettage	25
2.2.3. Dento-dental immobilization	25
2.2.4. Photodynamic therapy	25
2.2.5. Antiseptic and alternative therapy	25
3. Prophylaxis of maxillary bone defects by stimulating local proliferation with growth factors and BMP	26
3.1. Bioreactivation with platelet-rich plasma	26
3.2. Bioreactivation using pulsed short waves	28
3.2.1. Characteristics of pulsed short waves	28
3.2.2. Biological effects of pulsed short waves	28
3.2.3. Indications with an impact on bone-ligament structures	29
3.2.4. Methodology of using the Diapulse device	30
4. Treatment of maxillary bone defects by using bone morphogenetic protein preparations	31
4.1. Bone morphogenetic proteins and their role in the therapy of maxillary bone defects	31
4.1.1. The mode of action of BMP	31
4.1.2. Functions of BMP	31
4.2. Stimulation of local production of BMP	32
4.3. Treatment with BMP preparations used in the reconstruction of alveolar defects, fractures and clefts	32
PERSONAL CONTRIBUTION	35
1. Work hypothesis. Objectives	37
2. General methodology	39
2.1. Experimental studies	39
2.2. Clinical studies	42
3. Study 1. Induction of chronic periodontal disease in sheep – a pilot experimental study	43
3.1. Introduction	43
3.2. Work hypothesis. Objectives	44
3.3. Materials and methods	45
3.4. Results	47
3.5. Discussions	57
3.6. Conclusions	61
4. Study 2. Bovine bone xenografts enriched with atelocollagen type 1 combined with autologous blood derivatives, used in a composite system in alveolar bone augmentation – an experimental study on sheep	63
4.1. Introduction	63
4.2. Work hypothesis. Objectives	64
4.3. Materials and methods	65
4.4. Results	69
4.5. Discussions	72

4.6. Conclusions	74
5. Study 3. Presence of BMP7 as part of the bone augmentation biomaterial used in a composite system	75
5.1. Introduction	75
5.2. Work hypothesis. Objectives	75
5.3. Materials and methods	76
5.4. Results	79
5.5. Discussions	84
5.6. Conclusions	86
6. Study 4. Impact of the environment of origin, systemic disorders, socioeconomic status and lifestyle on maxillary bone and periodontal system integrity	87
6.1. Introduction	87
6.2. Work hypothesis. Objectives	87
6.3. Materials and methods	88
6.4. Results	94
6.5. Discussions	101
6.6. Conclusions	103
7. Study 5. Use of pulsed short waves in the remineralization of maxillary alveolar bone structures in patients with diabetes mellitus	105
7.1. Introduction	105
7.2. Work hypothesis. Objectives	106
7.3. Materials and methods	107
7.4. Results	117
7.5. Discussions	121
7.6. Conclusions	123
8. General conclusions	125
9. Originality and innovative contributions of the thesis	127
REFERENCES	129
ANNEXES	146

Key words: maxillary bone defects, chronic periodontitis, bone morphogenetic proteins, BMP7, bone xenografts, pulsed short waves, remineralization

LIST OF PUBLICATIONS

Articles published *full text* as a result of the doctoral research

1. Alexandru Bogdan-Cătălin, Monica Popa. Complex oral rehabilitation in an elderly patient with periodontal disease who exercises regularly. *Palestrica of the Third Millennium Civilization and Sport*, 2016; 17(2):134-139. *CNCSIS B+* (study included in Chapter 4).
2. Alexandru Bogdan-Cătălin, Popa Monica, Dogaru Gabriela, Constantin Anne-Marie, Georgiu Carmen, Șovrea Alina Simona. Pulsed short waves in the remineralization of alveolar bone structures of the jaw in patients with diabetes mellitus – a series of cases. *Balneo Research Journal*, 2019; 10(4):478-488. *ISI, Impact factor - 0* (study included in Chapter 5)
3. Bogdan-Cătălin Alexandru, Monica Popa, Cosmin Peștean, Robert Purdoiu, Liviu Oana, Anne-Marie Constantin, Ramona Amina Popovici, Alina Simona Șovrea, Carmen Georgiu, Gabriela Dogaru. The Effect of Type 1 Atelocollagen in Association with Blood Self-derivatives in Alveolar Bone Augmentation. *Rev. Chim*, 2020;71(4): 390-400. *ISI, Impact factor - 1.34* (study included in Chapter 2).
4. Alexandru Bogdan-Cătălin, Monica Popa, Liviu Oana, Carmen Georgiu, Flaviu Tabaran, Adrian Macri, Purdoiu Robert, Dan Istrate, Gabriela Dogaru, Camelia Lazăr, Bosca Bianca, Cosmin Peștean, Anne-Marie Constantin, Șovrea Alina. Induction of chronic periodontal disease in an experimental sheep model: clinical, radiological and histological evaluation. *Rom Biotechnol Lett*. 2020; 25(3): 1511-1525. *ISI, Impact factor - 0.619* (study included in Chapter 1).

INTRODUCTION

The current study evidences the multifactorial etiology of maxillary bone defects, mainly addressing the most obvious problems, i.e. alveolar bone resorption in periodontal diseases, which can be both the consequence of systemic disorders and drug treatments or, in most of the cases, can be caused by local factors determined by an individual's lifestyle (oral dental hygiene, diet, bad habits, presence or absence of physical exercise). At the same time, iatrogenic factors should also be considered, which are represented by overcontoured fixed prosthetic restorations, removable prosthetic restorations that are not adapted to the requirements specific to the prosthetic fields, overcontoured tooth neck fillings, etc. All these aspects favor alveolar bone resorption and bone atrophy.

The scientific literature reports the presence of bone defects, which are most frequently bilateral vestibular, in about 20% of the teeth (1). Occlusal traumas can lead in time to the development of bone defects in the alveolar processes, especially when thin cortical bones are present (3).

Primordial prophylaxis with an impact on maxillary bone defects refers to social and environmental factors with relaxation or stress potential, which include (17): lifestyle, education, access to health care services, influence of an individual's entourage, the possibility of avoiding interpersonal violence.

Primary or post-exposure prophylaxis includes etiological and risk factors, also taking into consideration the protection of the vulnerable population (17), which most frequently requires help, including psychosocial counseling, for referral to health care services and authorities.

Secondary prophylaxis is aimed at reducing the prevalence of the disease by early detection, at an asymptomatic stage, and by initiating adequate treatment. It is applied by screening tests or counseling (17).

Tertiary prophylaxis includes the curative methods required to reduce the development of the disease and to prevent complications as well as the evolution and acute episodes of the disease (22, 23, 24).

Local prophylaxis of maxillary bone defects can be achieved by prophylaxis and prevention of maxillary bone fractures (37), congenital abnormalities and periodontal diseases (adequate lifestyle, appropriate oral dental hygiene, periodic dental examinations, treatment of edentation, avoidance and/or correction of iatrogens during dental, prosthetic, endodontic treatments (42), periodic imaging examinations). It is also achieved by stimulating the local proliferation of growth factors including BMPs through:

1. Bioreactivation with platelet-rich plasma is generally intended for involutive dystrophic periodontal disease and also for supplementing periodontal therapy in order to improve the results (60).

2. Bioreactivation using pulsed short waves which present the effects found in pathophysiological links influencing the jaw bone and periodontal system structure, with a role in eliminating residual depolarization states, with the restoration of physiological resting membrane polarity (69), stimulation of local cell activities, stimulation of the production of collagen and fibrin deposits, tissue regeneration (270), obviously improves osteoporosis.

3. Maxillary bone defect augmentation can be performed by using bone morphogenetic protein preparations, with a role in the local induction and conduction of BMPs, in the bone and cartilage forming process (83). Using recombinant human BMPs is promising in facilitating bone regeneration and healing after dental implant placement (98, 106, 107), in the surgical correction of intraosseous, supra-alveolar, furcation and fenestration defects (108, 109).

PERSONAL CONTRIBUTION

1. Work hypothesis. Objectives

The experimental studies were focused on the bone defects induced by chronic periodontal disease, because these are the most common in clinical practice. Chronic periodontal disease was the easiest to induce in the study on a large size animal, while avoiding the suffering of the animals.

Apart from inducing the disease, the therapeutic experimental studies aimed to assess the efficacy of guided alveolar bone regeneration as part of bone augmentation performed in a composite system with lyophilized bovine bone enriched with atelocollagen type 1 combined with autologous blood derivatives, and to evaluate the presence of BMP7 at six weeks postoperatively.

The clinical studies were aimed at statistically evidencing the positive effects of the general prophylactic measures targeting factors related to lifestyle that can affect the integrity of maxillary bone structures. We also attempted to demonstrate the destructive impact on maxillary alveolar bone structures caused by a sedentary lifestyle, an inadequate diet and the presence of local irritating factors at the level of the marginal periodontium. For therapeutic purposes, we monitored the potential of electro-physiotherapy in the regeneration of maxillary alveolar bone structures. The positive biotrophic effects of this therapy, represented by the normalization of ATPase activity, restoration of resting membrane activity and stimulation of the production of collagen and fibrin deposits, induce collagen stratification and subsequent stimulation of osteogenesis.

2. General methodology

The experimental studies were conducted based on the approval no. 23 of 23.01.2015 of the Ethics Committee of "Iuliu Hațieganu" UMPH Cluj-Napoca. The study included five Ovis aries sheep (Romanian Turcana breed) aged five years,

non-pregnant females. An experimental animal model was carried out and histological preparations in different stains (hematoxylin-eosin (H&E), PAS, Giemsa, Gram) and immunohistochemical analysis were performed.

Clinical studies: the clinico-statistical study evaluated the impact of lifestyle on maxillary bone integrity, the impact of diseases that favor the development of maxillary bone defects, over a period of seven years, at the Cluj County Clinical Emergency Hospital. The clinico-therapeutic study was aimed at the radiological and clinical evaluation of the electro-physiotherapy results and investigated the possibility of introducing this method as part of bone regeneration therapies.

3. Study 1. Induction of chronic periodontal disease in sheep – a pilot experimental study

3.1. Introduction

Chronic periodontal disease (CPD) is a persistent immune inflammatory disease, with a marked impact on the tooth-supporting tissues (119), extremely complex and multifactorial, with a difficult and controversial classification. CPD includes a wide range of diseases and presents many types; it can be localized or generalized and can be additionally classified depending on its extension and severity, as well as depending on its association with risk factors and systemic diseases (120). CPD predominantly affects adults (121) and is one of the main causes of edentation in patients aged over 40 years (122).

Sheep have a natural predisposition to periodontal disease, which is also termed “broken mouth”, a disease that according to microbiological studies contains bacteria found in clinically manifest human periodontal disease. Also, sheep have bone anisotropy very similar to that found in humans (139, 140), an aspect with major impact on periodontal status.

3.2. Work hypothesis. Objectives

Work hypothesis – We used as a work hypothesis the identification of environmental factors and local factors frequently found in human pathology, with a pathogenic role in the development of periodontal disease. We considered the following as potential pathogenic factors for induction of CPD: sedentary lifestyle, inadequate food intake and instillation of periodontal exudates collected from patients with chronic periodontal disease, followed by chronic irritation of the marginal periodontium, for a long time period.

Objectives – We aimed to define a new experimental technique for inducing chronic periodontal disease, similar to human forms, in the experimental sheep model, given the onset and the natural evolution of the disease in sheep.

3.3. Materials and methods

For a correct diagnosis of the periodontal status corresponding to the species, the animals of the control and experimental groups were evaluated by radiological examination, initial periodontometry strictly performed in the front mandibular teeth. Local intervention on the marginal periodontium was performed and strict dietary and environmental conditions were applied.

Statistical analysis used the T test for paired samples and for independent samples with unequal variables; following equality of the previously tested variables, the F test was used.

3.4. Results

During the disease induction period of ten months, after initial evaluation and local surgery, followed by administration of the food ration and accommodation in a space allowing extensive movement of the animals, the following changes were observed: gum recession, presence of bleeding on probing, differences in depth on periodontal probing and exfoliation of some teeth, without associated organic disorders or weight loss. The animals were reexamined after a period of ten months.

The increases in both periodontal probing depth and tooth mobility were quantified statistically and major differences were obtained in the six reference points, with highly statistically significant results.

By radiological evaluation, at the end of the experiment, interdental septal demineralization and other changes were observed: reduced volume of the bone septum with bone resorption, an extended and deeper desmodontal space; calculus deposits below the cemento-enamel junction, enlarged desmodontal space after induction of the disease; bone demineralization after induction of the disease.

Pathomorphological evaluation evidenced a microscopic appearance of periodontal destruction, with many histopathological changes: inflammatory reactions, bone resorption, cementum dentin resorption, dental-periodontal ligament destruction, even the presence of bacterial species found by special histological stains. Hematoxylin-eosin stain evidenced inflammatory reactions and tissue destruction, while PAS, Giemsa and Gram stains evidenced bacterial colonies.

3.6. Conclusions

1. Maintaining a healthy periodontal support has a positive impact on host immunity and can be a factor of prevention for other systemic inflammatory disorders.

2. Bacterial plaque control, removal of calculus and all local irritating factors acting on the marginal periodontium are essential in stopping gingivitis, loss of periodontal attachment and finally, of teeth.

3. Dietary imbalances with decreased calcium absorption can favor the induction of periodontal disease. A diet poor in carbohydrates and rich in omega-3 fatty acids and vitamins C and D can significantly reduce gingival-periodontal inflammation.

4. The experimental sheep model for periodontal disease has many similarities to the human condition and could allow a more rapid study of some therapeutic methods.

5. Even if larger numbers of animals are required for a classification regarding physiological tooth mobility and physiological probing depth, natural periodontal disease in sheep represents an important argument for using sheep as an experimental model for chronic periodontal disease.

6. Conducting more extensive studies with objective measurements of the serological markers of periodontal disease could be useful to confirm the importance of this animal model.

4. Study 2. Bovine bone xenografts enriched with atelocollagen type 1 combined with autologous blood derivatives, used in a composite system in alveolar bone augmentation – an experimental study on sheep

4.1. Introduction

Xenografts of bovine origin can be considered the equivalent of autografts (179); in these xenografts, physiological osteoclastic and osteoblastic remodeling occurs (179), the graft being minimally resorbed during the healing period (180). In this study, a bovine xenograft variant with macroporous structure, enriched with atelocollagen type 1 was used. Macroporous structures are ideal in osteoconduction, favoring vascular proliferation inside the augmentation mass, and atelocollagen stimulates platelet aggregation and favors the release of growth peptides responsible for osteoconduction.

4.2. Work hypothesis. Objectives

The animals chosen for the experimental study were sheep, which have been used in many studies in various dental research areas: healing of periodontal wounds (168), endodontic regeneration (194), stem cell therapy in bone regeneration (170), studies of implantology (171). A number of studies have reported similarities between ovine and human periodontal flora: *Treponema* (137), *Bacteroides melaninogenicus* / *Prevotella* (173, 178), *Bacteroides gingivalis* (172) can be present in both species. Consequently, this bacterial colonization, along with the natural evolution of periodontal disease and bone anisotropy in sheep, represent the main arguments for using the experimental sheep model.

We assessed the guided alveolar bone regeneration capacity in sheep, by using in a composite system a bovine xenograft preparation enriched with atelocollagen type 1 combined with PRP (platelet-rich plasma) and A-PRF (advanced platelet-rich fibrin) as a membrane, as well as the efficacy of this preparation in alveolar bone regeneration, in the context of the presence of chronic periodontal disease.

4.3. Materials and methods

Three *Ovis aries* sheep (Romanian Turcana breed), aged five years, non-pregnant multiparous females, with a weight of 40-60 kg, without cardiac or other organic disorders were used, which presented chronic periodontal disease and received periodontal treatments, including bone augmentation.

The periodontal status (41) and probing depth were evaluated. The treatment administered included antibiotic therapy, supragingival scaling and periodontal curettage. The bone augmentation of the maxillary alveolar processes associated with the periodontal system included lyophilized bovine bone and platelet-rich plasma, according to an adapted operating technique.

4.4. Results

The results were histologically assessed at six weeks postoperatively. The biomaterial was partially transformed into hypercellular area, cartilage, bone structure and periodontal ligaments. The “transformation” of the biomaterial into bone starts in the depth, at the contact with the host mesenchymal tissues, fibrocartilaginous ossification gradually replacing and using the material from the periphery to the center, similarly to cicatricial fibrosis/callus. At an intermediate moment during this process, the biomaterial, many undifferentiated mesenchymal cells (small, with scarce cytoplasm, small, basophilic nucleus) immediately adjacent to the biomaterial, surrounding fibroblasts secreting collagen fibers, and at the periphery, in direct contact with the host tissue (in this case the alveolar bone, the desmodontium or the gingival fibromucosa), fibrocartilage, cartilage and new bone can be concomitantly observed. The new bone presents hypercellular biomaterial inclusions.

4.6. Conclusions

1. Alveolar bone augmentation performed with bovine xenograft improved with atelocollagen type 1 and combined with PRP and A-PRF respectively as a membrane led to positive results after evaluation at six weeks from the intervention.

2. The biomaterial used ensures very good alveolar bone regeneration, with a reduction of postoperative reactions and no adverse effects.

5. Study 3. Presence of BMP7 as part of the bone augmentation biomaterial used in a composite system

5.1. Introduction

Over the past years, particular importance has been given to biomaterials used in guided alveolar bone regeneration, bovine xenografts being among the biomaterials of choice. The best results in guided tissue regeneration (GTR) are provided by bone autografts and biomaterials that contain recombinant growth factors. BMP-7, which belongs to the TGF- β family, plays a main role in the transformation of mesenchymal stem cells into bone and cartilage and is predominantly found in autologous blood derivatives (182).

5.2. Work hypothesis. Objectives

BMP-7 plays a role in osteoblast differentiation and is predominantly found in autologous blood derivatives (182).

The aim of this experimental study was to assess alveolar bone augmentation performed in a composite system in sheep, as part of the treatment of chronic periodontal disease, with bovine xenografts enriched with atelocollagen type 1, combined with PRP and covered with membranes made of A-PRF, as well as to evidence and evaluate the bone morphogenetic protein 7 (BMP-7) in bone augmentation areas, after six weeks from the intervention.

5.3. Material and method

This experimental study included three *Ovis aries* sheep (Romanian Turcana breed), aged five years, non-pregnant multiparous females, with a weight ranging between 40-60 kg, without cardiac or other organic disorders, which had chronic periodontal disease and received periodontal treatments, including bone augmentation.

After chronic periodontal disease was diagnosed, and prophylactic treatments and closed field periodontal curettage were performed, alveolar bone augmentation using a composite system was carried out.

The quantitative and qualitative expression of BMP7 in the periodontal regeneration markers was assessed.

The bone augmentation score was determined by adding up the scores of 12 categories. The categories were established depending on the presence of: desmodontal ligaments, biomaterial, cellular biomaterial, cartilage, cartilage +biomaterial, new bone, new bone+biomaterial, mucosa, cementum, cellular cementum, osteocytes, osteoblasts. The analyzed elements were chosen depending on the characteristics of periodontal tissues found during the process of differentiation, the technique being similar to that of other similar studies (220).

Statistical analysis was performed using the Mann Whitney test. The relationship between the analyzed parameters was assessed using the Pearson correlation coefficient in the case of non-dispersed data and Spearman correlation coefficient in the case of dispersed data. A p value lower than 0.05 was considered statistically significant. Statistical analysis was performed with SPSS 25 and Microsoft Excel.

5.4. Results

In group I (control group), histological H-E examination evidenced the presence of inflammation, periodontal ligament destruction, calculus deposits, bacterial plaque and foreign bodies in the desmodontal space. In the control group with chronic periodontal disease, BMP7 was evidenced in osteoblasts and osteocytes. In group II (exposed-treated group), histological evaluation based on H-E staining was performed. At six weeks, immunohistochemistry showed the presence of BMP7 in the biomaterial, desmodontium, osteocytes, osteoblasts and in the vicinity of fibroblasts, chondrocytes, newly formed bone. The highest intensity of staining was found in the biomaterial, where it decreased with the increase in its cellularity and transformations, the stained biomaterial inclusions specific to BMP7 clearly appearing both in the forming bone and in fibroblasts.

From a statistical point of view, there were significant differences between groups I and II regarding: ligaments, biomaterial, cellular biomaterial, cartilage, cartilage with biomaterial, and new bone. The development of the periodontal system was much more statistically significant in group II, where more statistical correlations were registered.

5.6. Conclusions

1. The results of this *in vivo* study show a very good capacity of the studied biomaterial to induce osteoperiodontal tissue differentiation.

2. The components of the graft performed in a composite system (osteogenic cells, osteoconductive factors, porous osteoconductive matrix and growth factors with sequential release from autologous blood derivatives, including BMP7) ensure the optimal conditions required for alveolar bone regeneration.

3. Platelet-rich plasma is more effective when test tubes with added heparin are used, which binds the growth factors, including BMP7.

4. The most statistically significant effects of the xenograft used in a composite system were the induction of cell differentiation into osteoblasts and the formation of new bone.

6. Study 4. Impact of the environment of origin, systemic disorders, socioeconomic status and lifestyle on maxillary bone and periodontal system integrity

6.1. Introduction

All forms of periodontal disease – traumas, acute or chronic periodontal disease, bruxism, bone involution due to senescence, tumor resection in the jaws – represent a pathology frequently found in dental medicine services.

The predisposition to certain osteoperiodontal diseases increases over time due to cumulation of the pathogenic effects of various chronic diseases (247). Excluding bad habits with a negative impact on the jaws and the periodontium, along with individualized oral rehabilitation, significantly improves the chances of maintaining an optimal dental periodontal status for long time periods (41, 248, 249).

6.2. Work hypothesis. Objectives

Taking into consideration the dental geriatrics elements and the periodontal and prosthetic treatment stages, as well as patient compliance, can offer positive results related to the increase in quality of life for long time periods.

The data obtained from S.P.C.J.U-CJ through registration of the population requesting routine or emergency treatments offered a comprehensive image of the results provided as part of periodontal and prosthetic treatment stages.

The clinical study conducted in the private dental office on selected geriatric patients can evidence the relationship between periodontal involution due to senescence in elderly patients and lifestyle aspects including individualized oral hygiene, moderate intensity physical exercise, periodic balneoclimatic procedures and an antioxidant-rich diet.

6.3. Material and method

Data collection

A retrospective study over a 7-year period was conducted in the population that visited the dental offices of the Cluj County Clinical Emergency Hospital.

For statistical analysis, the data were presented as relative frequencies. The trend by year was analyzed using univariate linear regression, with the Microsoft Excel application. The statistical significance of the trend was calculated. Significant p was considered below 0.05.

Morbidity for the period 2015-2019 was analyzed and the diseases of the gums and edentulous alveolar ridge were evaluated, for which univariate linear regression analysis was used, by age categories, for a period of five years.

Clinical case

In the current study, we presented the maxillary bone status in the case of a 78-year-old patient who had a healthy lifestyle according to the above description. Data related to the history, tests applied, prosthetic diagnosis, periodontal diagnosis, treatment plan were presented.

6.4. Results

The following results were presented: prophylactic activities compared to all other treatments between 2013-2019 and their trend, unfinished treatments compared to the rest of treatments between 2013-2019 and their trend, scaling sessions compared to the rest of treatments between 2013-2019 and their trend, tooth extractions compared to the rest of disorders between 2013-2019 and their trend, morbidity for diseases of the gums and edentulous alveolar ridge and other maxillary diseases compared to the rest of disorders between 2015-2019 and their trend, morbidity for diseases of the gums and edentulous alveolar ridge and for other maxillary diseases compared to the rest of disorders between 2015-2019 and their trend in the 0-14 years age group, morbidity for diseases of the gums and edentulous alveolar ridge and other maxillary diseases compared to the rest of disorders between 2015-2019 and their trend in the 15-64 years age group, morbidities for diseases of the gums and edentulous alveolar ridge and other maxillary diseases compared to the rest of disorders between 2015-2019 and their trend in the 65 years and over age group. The medical activity of the dental office as part of the emergency service between 2013-2014 was presented.

The presented clinical case showed that senescent periodontal involution can develop within functional limits (lack of inflammation and tooth mobility), in the context of a healthy lifestyle including: regular physical exercise, maintenance of individualized oral hygiene by using auxiliary hygiene methods, constant antioxidant intake, etc.

6.6. Conclusions

1. Prophylactic activities (including scaling sessions) and the number of unfinished procedures presented decreasing evolution trends in all age groups.

2. The diseases of the gums and edentulous alveolar ridge presented a statistically significantly increasing evolution trend, with annual doubling in the 15-64 years age group, best evidencing the impact of socioeconomic status.

3. In the elderly, the general oral health status worsened; the prevalence of all types of diseases, including those of the gums and edentulous alveolar ridge, significantly increased.

4. Maintaining the biological space of the marginal periodontium, by correctly positioning the FPD limits and the margins of the removable partial denture, as well as correctly placing the contact points allows maintaining a healthy periodontium.

5. Lifestyle (antioxidant-rich diet, regular physical exercise, balneoclimatic procedures, avoidance of bad habits, adequate hygiene) significantly improves patient's chances for a favorable periodontal prognosis.

6. With regard to the clinical case, providing additional support by immobilizing teeth with senescent periodontal involution (metal-ceramic FPD) ensures a much stronger periodontal support for a prosthetic treatment plan using a composite system.

7. Endodontic treatments in patients with senescent periodontal involution have an impact on periodontal structures, given the terminal vascularization of teeth.

7. Study 5. Use of pulsed short waves in the remineralization of maxillary alveolar bone structures in patients with diabetes mellitus

7.1. Introduction

Resorption and demineralization of maxillary alveolar bone structures, in the presence of teeth, are frequently found in outpatient dental services and are associated with periodontal diseases, which can take the following forms: aggressive, chronic, necrotic and periodontal abscesses (41).

Using pulsed short waves is beneficial for cells, stimulating the release of increased amounts of energy required for repair processes and intensifying alveolar bone regeneration.

7.2. Work hypothesis. Objectives

The current study aimed to evidence alveolar bone tissue remineralization and regeneration, in the absence of associated bone augmentation treatment.

The objectives of this study concerned the case report of three patients aged between 50 and 78 years, who had chronic periodontal disease and type 2 diabetes mellitus and who underwent pulsed short wave procedures.

7.3. Materials and methods

The study was carried out based on the approval of the Ethics Committee of the "Iuliu Hațieganu" University of Medicine and Pharmacy Cluj-Napoca and on the subjects' informed consent.

In the period 2015-2017, the patients presented to the private dental office, requiring complex oral rehabilitation for several dental disorders, including chronic periodontal disease in the context of the presence of type 2 diabetes mellitus.

We presented data related to: history, tests applied, dental, endodontic and periodontal diagnosis, dental, endodontic, surgical and periodontal treatments, and pulsed short wave therapy.

7.4. Results

Alveolar bone remineralization after initiation of pulsed short wave therapy visibly occurred in all three cases included in the study in a short time, with better than expected results. Bone regeneration was radiologically visible around the teeth, which underwent closed field periodontal curettage. The contour of the bone defects surrounding the teeth had a tendency to reorientation of bone trabeculae towards the tooth roots after completion of pulsed short wave treatments. In other dental areas, in which the bone defects were vertical, a higher bone density was observed around the roots, as well as an increased bone volume even in vertical direction.

The first case presented much more intense alveolar bone remineralization compared to the remineralization of the bone structure in the edentulous gap area. In the second case, advanced remineralization of the maxillary and mandibular alveolar bone structures was found after eight weeks from the initiation of pulsed short wave therapy and completion of closed field curettage.

In the third case, three weeks after initiation of pulsed short wave therapy, alveolar bone remineralization was observed, the most remarkable bone regeneration being in the alveolar processes of the teeth. Radiological reexamination after three years from completion of the treatments showed the maintenance of the bone volume when preventive-prophylactic recommendations were respected, with the persistence of completely mineralized marginal alveolar bone structures, interdental and apical septa.

7.6. Conclusions

1. The results of pulsed short wave therapy can last for long time periods if oral dental hygiene is maintained.
2. The pulsed short wave protocol in the treatment of alveolar bone loss in diabetic patients is a less invasive alternative compared to periodontal flap surgery, even in cases with aggressive bone loss.

3. Pulsed short waves represent a non-invasive therapeutic method that ensures alveolar bone regeneration in a relatively short time.

8. General conclusions

1. The experimental sheep model, through the presence of natural periodontal disease, has important similarities to the human condition and could allow a more rapid study of therapeutic models.

2. Conducting more extensive studies, with the determination of the serological markers of periodontal disease can be useful to confirm the importance of the animal model.

3. The bone augmentation of the maxillary alveolar processes with a bovine xenograft (enriched with atelocollagen type 1) in a composite system in combination with PRP and A-PRF (as a membrane) provided very good therapeutic results at six weeks postoperatively.

4. The biomaterial used in a composite system was well tolerated and did not cause any complications or rejection.

5. Through the content of osteogenic elements (cells, osteoconductive factors, porous osteoconductive matrix) and through the sequential release of growth factors (BMPs from autologous blood derivatives), the biomaterial used in a composite system ensures the optimal conditions required for alveolar bone regeneration and high therapeutic efficacy.

6. The biomaterial used in a composite system proved its efficacy through its property to bind growth factors, including BMP7.

7. The reduced application of prophylactic measures caused a statistically significant increase in the frequency of the diseases of the gums and edentulous alveolar ridge in the 15-64 years age group, best evidencing the impact of socioeconomic status, and in the elderly the prevalence of all types of disorders increased significantly.

8. Factors related to patients' lifestyle (diet, exercise, avoidance of bad habits, rigorous hygiene) ensure the maintenance of a healthy osteoperiodontal support and are factors of prevention for the development of periodontal disease.

9. Bacterial plaque control, removal of calculus and all local irritating factors acting on the marginal periodontium are essential in preventing the loss of periodontal attachment and finally, of teeth.

10. Immobilizing teeth with senescent periodontal involution by correctly positioning a FPD, while preserving the biological space of the marginal periodontium, ensures a much stronger periodontal support for restorative treatment.

11. Pulsed short wave therapy in alveolar bone resorption is a less invasive therapy compared to periodontal surgery, even in cases with significant bone loss in the presence of diabetes mellitus.

12. Pulsed short waves represent an effective therapeutic method, with results that can persist for long time periods, provided that correct oral dental hygiene is maintained and constant follow-up of both dental disorders and associated general diseases is ensured (e.g. cases of diabetic patients).