
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Cercetări privind stimularea regenerării tisulare orale ghidate

Doctorand **Sergiu Vacaraș**

Conducător de doctorat Prof.dr. **Grigore Băciuț**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	13
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	15
1.Principiile regenerării tisulare ghidate	16
1.1. Introducere. Terminologie	17
1.2. Regenerarea tisulară	18
1.3. Regenerarea osoasă ghidată	18
1.4. Principiile regenerării osoase ghidate	19
1.5. Materiale utilizate în tehnica regenerării tisulare ghidate	21
1.6. Aplicații practice ale regenerării osoase ghidate	23
2. Membrane utilizate pentru regenerarea tisulară ghidată	25
2.1. Introducere	25
2.2. Rolul membranelor în tehnica GBR	26
2.2.1. Membrana ideală	26
2.2.2. Proprietățile membranelor barieră	27
2.2.3. Rigiditatea membranelor	27
2.2.4. Stabilitatea mecanică a membranelor	28
2.2.5. Porozitatea și topografia membranelor	28
2.3. Tipuri de membrane folosite în tehnica GBR	28
2.3.1. Membranele resorbabile	29
2.3.1.1. Membranele din colagen	30
2.3.1.2. Membranele resorbabile sintetice	31
2.3.1.3. Membranele din chitosan	33
2.3.1.4. Membranele din gelatină	34
2.3.1.5. Membranele din concentrare plachetare (PRP, PRGF și PRF)	34
2.3.1.6. Alte tipuri de membrane resorbabile	37
2.3.1.7. Rata de resorbție a membranelor	37
2.3.2. Membranele neresorbabile	38
2.3.2.1. Membranele sintetice neresorbabile din politetrafluoroetilenă (PTFE)	39
2.3.2.2. Membranele din titan	40
2.3.2.3. Membranele din mătase	42
3. Tehnici utilizate în GTR pentru ameliorarea regenerării tisulare orale ghidate	45
3.1. Combinarea membranelor de regenerare tisulară ghidată cu PRP în refacerea defectelor osoase apicomarginale. Analiză comparativă	45
3.2. Utilizarea grefelor de țesut conjunctiv în regenerarea tisulară ghidată pentru acoperirea defectelor radiculare. Evaluarea comparativă a rezultatelor	46
3.3. Rezultatele tehnicilor combinate	47
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	49
1. Ipoteza de lucru și obiective	51
2. Metodologie generală	53
3. Studiul 1. Fundamentarea utilizării medicale a polimerilor și compozitelor resorbabile pe bază de polilactide. Studiul domeniilor de aplicare și evaluarea impactului asupra regenerării tisulare	55
3.1. Introducere	55
3.2. Ipoteza de lucru	56
3.3. Material și metodă	56

3.4. Rezultate	57
3.4.1. Contextul istoric și producția	57
3.4.2. Proprietăți chimice și fizice, impact clinic și metabolic al APL	58
3.4.3. Stabilitatea și factorii care influențează modificări ale proprietăților	59
3.4.4. Industrie, piața alimentară, poluarea mediului înconjurător	61
3.4.5. Biocompatibilitatea	62
3.4.6. Studii pe animale	63
3.5. Discuții	63
3.5.1. Utilizare medicală. Avantajele compozitelor	63
3.5.2. Nanocompozitele APL și nanocompozitele grafenă-APL	64
3.5.3. Domenii medicale	72
3.5.4. Sisteme de fixare resorbabilă a fracturilor în chirurgia craniomaxilofacială (CMF)	74
3.5.5. Sisteme pentru transportul și livrarea țintită a medicamentelor	81
3.5.6. Inginerie tisulară	82
3.5.7. Tratamentul plăgilor: suturi, meșe, filme, membrane, bariere resorbabile	83
3.6. Concluzii	86
4. Studiul 2. Studiu-pilot experimental de constituire a unui model animal pentru evaluarea calității unui material pentru regenerarea tisulară orală	89
4.1. Introducere	89
4.2. Ipoteza de lucru	90
4.3. Material și metodă	91
4.4. Rezultate	96
4.4.1. Vindecarea mucoase orale	96
4.4.2. Vindecarea osoasă	102
4.5. Discuții	106
4.6. Concluzii	111
5. Studiul 3. Validarea în premieră a unui copolimer de polilactid în regenerarea țesuturilor orale: studiul biomaterialului Suprathel® pentru vindecarea epitelială și osoasă ghidată	113
5.1. Introducere	113
5.2. Ipoteza de lucru	114
5.3. Material și metodă	115
5.4. Rezultate	123
5.5. Discuții	130
5.6. Concluzii	135
6. Concluzii generale	137
7. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	139
REFERINȚE	141

Cuvinte cheie: regenerare tisulară ghidată, membrane, acid polilactic, biomateriale.

INTRODUCERE

Regenerarea tisulară ghidată reprezintă o problemă de mare importanță în procesul de vindecare a țesuturilor moi și dure în urma diverselor evenimente (traumatisme, atrofie) care au contribuit la pierderea acestora. Tehnicile tradiționale de reconstrucție cu grefe autologe prezintă multiple dezavantaje, ceea ce a dus la intensificarea demersurilor de cercetare pentru obținerea materialelor biocompatibile capabile să substituie aceste grefe.

Biomaterialele pe bază de acid polilactic (PLA) prezintă un potențial înalt în acest sens, fiind biocompatibile, solubile, dar având și foarte bune proprietăți de barieră. Polilactidele și compozitele pe bază de acid polilactic prezintă un avantaj uriaș prin rezistența la atacul microbial, pentru că nu există enzime care să poată distruge polimerii sintetici. Există șanse reale ca acidul polilactic și compușii săi să fie considerate printre cele mai importante materiale utilizate în regenerarea tisulară ghidată.

Teza de față își propune să studieze, pornind de la principiile regenerării tisulare ghidate, utilizarea biomaterialelor resorbabile pe bază de copolimeri ai acidului polilactic în regenerarea tisulară ghidată orală (epitelială și osoasă). S-a analizat în amănunt literatura de specialitate publicată până în prezent pe această temă după care s-a testat și evaluat în premieră în cadrul unui studiu-pilot animal, un biomaterial validat pentru vindecare tegumentară (Suprathel®), pentru regenerare tisulară orală ghidată. Inițial a fost realizat un studiu pilot, după care s-a realizat un studiu mai amplu, de tip split-mouth, pe model animal (20 de iepuri) în cadrul căruia s-a evaluat cu ajutorul histologiei eficacitatea materialului Suprathel® ca membrană-barieră în regenerarea tisulară ghidată.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Această secțiune a lucrării prezintă aspecte generale cu privire la principiile generale ale regenerării tisulare ghidate, în ceea ce privește terminologia, principii biologice de regenerare a osului și a părților moi, epitelului și mai ales materiale utilizate în aplicații clinice.

Membranele utilizate în regenerarea tisulară ghidată sunt descrise în detaliu din punct de vedere al materialului ideal, precum și al proprietăților fizice și biologice. Al doilea capitol al acestei părți prezintă și o clasificare a membranelor (resorbabile și neresorbabile) precum și avantajele și dezavantajele acestora.

Ultimul capitol din prima parte a tezei se referă la tehnicile utilizate în regenerarea tisulară ghidată, cu precădere în cavitatea orală și la tehnici combinate care urmăresc obținerea de rezultate optime.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Cea mai amplă secțiune a tezei conține contribuțiile personale ale doctorandului aduse în desfășurarea acestor studii la dezvoltarea tehnicilor și mai ales a materialelor utilizate ca barieră în regenerarea tisulară ghidată. Sunt incluse un număr de 3 studii care descriu metodologia și rezultatele cercetării. Obiectivele lucrării sunt etapizate în trei faze după cum urmează: o primă fază urmărește analizarea domeniilor de aplicabilitate medicală a copolimerilor resorbabili cu capacități de stimulare a regenerării tisulare și fundamentării încadrării biomaterialelor de tip copolimeri de acid polilactic. A doua fază presupune conceperea și validarea unui model animal în cadrul unui studiu-pilot, unde este validat conceptul și este elaborată o scală customizată de criterii pentru evaluarea vindecării tisulare. Obiectivul final este acela de a verifica pe un lot animal care a cuprins 20 de iepuri calitățile de barieră în regenerarea tisulară ghidată ale biomaterialului Suprathel®, prin rezultatul statistic în comparația cu un material standardizat cu utilizare în acest sens.

Studiul 1. Fundamentarea utilizării medicale a polimerilor și compozitelor resorbabile pe bază de polilactide. Studiul domeniilor de aplicare și evaluarea impactului asupra regenerării tisulare.

Acidul polilactic (PLA) este un poliesterilor alifatic. În prezent este utilizat pe scară largă în multiple domenii. PLA are proprietăți fizice, chimice și mecanice care îl fac un candidat ideal pentru fabricarea dispozitivelor medicale absorbabile specifice și pentru folosirea sa în industria alimentară. Este biomaterialul ideal pentru utilizare medicală datorită descompunerii sale complete în apă și bioxid de carbon în organismul

uman. Este un biomaterial bioplastic, fiind derivat din biomasă și nefiind bazat pe rezerve petroliere neregenerabile, versatil și nepoluant în cadrul procesului de fabricație.

Studiul prezent a urmărit fundamentarea și evaluarea comparativă a celor mai importante domenii de utilizări medicale, precum și impactul biologic al polilactidelor și compozitelor pe bază de lactide. A fost întreprinsă o cercetare exhaustivă a literaturii pentru a viza scopul final al prezentei teze de doctorat.

A fost realizată o cercetare electronică structurată despre utilizarea compușilor pe bază de polilactide, care a cuprins bazele de date Pubmed și Web of Science dar și alte surse după care au fost selectate articolele relevante.

Rezultatele acestui studiu relevă aspecte interesante în ceea ce privește evoluția materialelor pe bază de acid polilactic, subliniază proprietăți fizico-chimice dar și biologice care le fac ideale pentru aplicații medicale și prezintă factori care influențează comportamentul acestor biomateriale. Biocompatibilitatea PLA este demnă de remarcat, atât în cadrul studiilor in vitro, cât și a studiilor in vivo.

În capitolul de discuții sunt analizate avantajele precum: procesabilitatea înaltă, proprietățile excelente de barieră și cele termice. Sunt discutate studii care urmăresc îmbunătățirea proprietăților mecanice precum și a rezistenței termice și la hidroliză a polimerilor de PLA dar și potențialul de implementare în practică a nanocompozitelor PLA și a nanocompozitelor grafenă-PLA. Restul capitolului de discuții urmărește pe larg aplicațiile medicale și avantajele pe care PLA le furnizează în acest domeniu, mai ales în sfera orală și maxilofacială, în regenerarea tisulară ghidată și în traumatologie.

Tot în acest capitol, polilactidele sunt prezentate ca sisteme de transport al medicamentelor (teranostică, terapia specifică țintită, combinată cu diagnosticarea țintită), printre polimerii hidrofilii (polivinil pirolidonă, poli 2 hidroxietil metacrilat și alcool polivinilic), polimerii hidrofobi (copolimeri de etilen-vinil-acetat, polidimetilsiloxani) și polimerii biodegradabili (polilactide, acid poliglicolic, policaprolactonă, polialchilcianacrilati și acid polilactic-co-glicolic). Combinarea poli-epsilon-caprolactonei (PCL) cu acidul polilactic pentru obținerea polimerilor modificați este și ea intens studiată.

Polilactidele și compozitele lor prezintă de asemenea toate proprietățile care le conferă statutul de material ideal și pentru ingineria tisulară (biocompatibilitatea, porozitatea adecvată, rezistența mecanică, pentru a proteja structura și conținutul porilor în timp, biodegradabilitatea).

Concluzile acestui prim studiu notează faptul că PLA și compozitele sale pe bază de copolimeri cu caracteristici metabolice superioare celorlaltor biomateriale vor câștiga supremația în multe domenii. Utilizările promițătoare ale PLA în domeniile medical și farmaceutic sunt demonstrate (ingineria tisulară, fixarea osoasă, tratamentul leziunilor și sistemul de transport al medicamentelor). PLA și compozitele sale reprezintă o reală alternativă verde pentru biomateriale și din punct de vedere al procesului ecologic de obținere. PLA au potențialul de a deveni cel mai important biopolimer medical al viitorului.

Studiul 2. Studiu-pilot experimental de constituire a unui model animal pentru evaluarea calității unui material pentru regenerarea tisulară orală.

Regenerarea tisulară ghidată (RTG) este o tehnică folosită cu mare succes în chirurgia orală și maxilofacială, stomatologie și în special în implantologie. Prezența și caracteristicile mucoasei orale keratinizate sunt aspecte cheie pentru asigurarea condițiilor de sănătate orală. Osul este al doilea cel mai transplantat țesut, precedat numai de sânge, regenerarea osoasă ghidată joacă deci un rol prioritar în cercetarea regenerării. Acest al doilea studiu a fost conceput pentru a evalua performanța unui material validat clinic pentru regenerarea pielii, și anume Suprathel® (Polymedics Innovations, Denkendorf, Germania), de această dată ca membrană-barieră în regenerarea țesuturilor orale. În cadrul acestui studiu, Suprathel® este comparat cu Mucoderm® (Botiss Biomaterials GmbH, Zossen, Germania), un material care a fost ales ca referință datorită utilizării sale obișnuite și extinse în RTG.

S-a pornit de la ipoteza că un model animal split-mouth ar fi util în vederea evaluării capacităților de membrană a copolimerului de polilactid Suprathel®. S-a efectuat în acest sens un studiu-pilot pe doi iepuri din rasa New Zealand, crescuți la Biobaza Universității de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” din Cluj-Napoca.

Pentru evaluarea capacității de vindecare epitelială dată de materiale, defectele de mucoasă au fost plănuite și create bilateral sub anestezie, în șanțul vestibular al fiecărui iepure, conform unui model split-mouth. Plastia de acoperire a defectelor de mucoasă s-a efectuat cu ajutorul celor două materiale, aplicate pe câte o parte. Pentru evaluarea vindecării osoase, intervențiile au implicat extracții bilaterale a doi premolari maxilari pe fiecare parte precum și a unui molar pe una dintre părți. Alveolele au fost acoperite consecutiv cu materialele investigate, aplicate pe ambele alveole premolare situate pe fiecare din părțile maxilare contralaterale. Alveola molară a fost utilizată drept referință (control) și lăsată neacoperită, pentru vindecare spontană. Analiza statistică a investigației histologice a fost realizată printr-un ansamblu customizat de criterii validabile statistic, cu scale de măsură și punctaje cuantificabile, constituite special într-un set creat în cadrul acestui studiu, pentru evaluarea vindecării tisulare prin tehnica standard-de-aur, histologia (scale Likert).

Rezultatele acestui studiu arată o bună vindecare în cazul ambelor materiale testate și descrie aspectele histologice ale vindecării, atât pentru mucoase cât și pentru os. Capitolul de discuții include o comparație a rezultatelor acestui studiu-pilot cu alte studii similare din literatură, pe materiale similare, realizate în trecut. De asemenea sunt discutate avantajele PLA la scară largă și particular în domeniul medical.

În concluzia acestui studiu se remarcă faptul că modelul split-mouth animal este validat pentru testarea Suprathel®. De asemenea, criteriile pentru evaluarea statistică a unui lot mai mare de animale pot susține o analiză statistică. Materialul examinat prezintă un potențial înalt de succes în RTG intraorală, datorită structurii și proprietăților sale (aplicare ușoară, grosime sporită și rezistență mecanică). Modelul experimental s-a dovedit a fi foarte versatil și a rezolvat problemele din această fază de testare, oferind o bază puternică pentru continuarea sa într-un experiment de amploare mai mare, pentru rezultate sustenabile.

Studiul 3. Validarea în premieră a unui copolimer de polilactid în regenerarea țesuturilor orale: studiul biomaterialului Suprathel® pentru vindecarea epitelială și osoasă ghidată

Regenerarea țesuturilor orale este o combinație sofisticată de procese intricate care apar în mod continuu în dependență de vârstă, deteriorarea patologică a gingiei și osului, traumă și pierderea dinților. Semnificația funcțională și anatomică a regiunilor implicate este foarte crescută, deficiența poate fi de la minoră la semnificativă sau chiar să afecteze viața. Osul alveolar atrofiat în urma pierderii dinților este evident atât clinic cât și paraclinic și pune serioase dificultăți în tratamentul pacienților edentați. Procedurile de conservare a alveolei postextractionale au fost studiate și implementate de mult timp. Cu toate acestea, încă nu există un consens privind cea mai bună metodă de conservare a osului alveolar. Caracteristicile ideale ale membranelor-barieră utilizate în astfel de cazuri trebuie să fie: biocompatibilitatea, funcția de barieră, să asigure lipsa inflamației locale, integrarea de către gazdă, manevrabilitate clinică, capacități de menținere de spațiu și de asigurare a condițiilor de vindecare tisulară specifică. Pe lângă atrofia osoasă, absența mucoasei keratinizate atașate a fost legată de disconfortul igienic și de adâncimea redusă a vestibulului.

Scopul acestui ultim studiu a fost investigația eficienței Suprathel® în regenerarea țesuturilor orale și stimularea cercetării inovative pentru îmbunătățirea regenerării țesuturilor orale. Utilizarea unei grefe de țesut conjunctiv pentru creșterea lățimii țesutului keratinizat este considerată ca fiind standardul de tratament dar se pune problema înlocuirii acestor grefe cu biomateriale, datorită multiplelor avantaje pe care acestea le furnizează. Pentru acest studiu au fost utilizați douăzeci de iepuri din rasa New Zealand de la Biobaza Universității de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” din Cluj-Napoca. Au fost excluse toate animalele care au prezentat semne de infecție sau au decedat în cursul experimentului. Studiul a fost randomizat și realizat în regim dublu-orb. S-au creat defecte mucozale de 5 x 5 mm în vestibulul frontal superior bilateral, în cavitatea orală a tuturor celor 20 de iepuri pentru evaluarea vindecării epiteliale iar pentru evaluarea vindecării osoase, a fost realizată extracția bilaterală a doi premolari maxilari de fiecare parte precum și a unui molar pe una dintre părți. A fost comparată o membrană de Suprathel® fabricată special, de grosime dublă (grosime de 250 de microni, de la Polymedics Innovations, Denkendorf, Germania) cu o membrană de Mucoderm®, disponibilă comercial (Botiss Biomaterials GmbH, Zossen, Germania).

Colorarea histologică s-a efectuat cu hematoxilină-eozină și conform tehnicii tricrom-Masson. Toate secțiunile au fost examinate de un histopatolog cu 25 de ani de experiență în evaluarea regenerării ghidate a țesuturilor orale. Procesul de evaluare a fost planificat pe baza criteriilor stabilite în studiul-pilot anterior.

Rezultatele studiului arată că nu s-au găsit diferențe semnificative între Mucoderm® și Suprathel® referitor la niciuna din caracteristicile de vindecare osoasă alveolară cuantificate de scorurile Likert în acest studiu. Atât Mucoderm® cât și Suprathel® au prezentat scoruri Likert semnificativ mai ridicate în comparație cu alveola cu vindecare naturală. Epitelizarea a apărut în cazurile ambelor materiale. Vindecarea epitelială cu hiperplazie cu tendință la hiperkeratoză cu ortokeratoză a fost găsită mai accentuată pentru Mucoderm® și mai redusă pentru Suprathel®.

Capitolul de discuții analizează semnificația rezultatelor, atât în ceea ce privește direcțiile de cercetare viitoare, cât mai ales în potențialul de aplicare clinică. Suprathel®, copolimerul de acid polilactic cu poli-epsilon-caprolactonă și trimetilen-carbonat prezintă avantaje semnificative în utilizare; aderă la contact și se adaptează la suprafața plăgii. Nu trebuie schimbat sau îndepărtat și se separă de suprafața plăgii odată cu epitelizarea acesteia. Atât Suprathel® cât și Mucoderm®, material utilizat specific în RTG orală au dat rezultate bune în cadrul acestui test, ambele superioare vindecării spontane. Rezultatele studiului sunt comparate cu alte articole pe teme similare din literatură, neexistând totuși niciun alt studiu cu un design similar și care să utilizeze aceleași materiale.

În concluzie acest studiu a realizat validarea în premieră a produsului Suprathel® (un material resorbabil, folosit deja cu succes pentru regenerarea pielii), ca material versatil și eficient de regenerare a epitelului și, prin funcția sa de membrană, a țesutului osos din cavitatea orală. Rezultatele acestui studiu deschid drumul unor studii clinice viitoare, care ar putea să investigheze în continuare întrebunțarea clinică a acestei proceduri foarte promițătoare pentru regenerarea ghidată a țesuturilor și osului din cavitatea orală, adăugând un material foarte util și versatil mijloacelor terapeutice existente.

CONCLUZII GENERALE

Teza prezintă a pornit de la principiile regenerării tisulare ghidate și a întreprins cercetări asupra extinderii utilizării biomaterialelor resorbabile pe bază de copolimeri ai acidului polilactic în regenerarea epitelială și osoasă orală.

În acest scop, a fost constituită în prima etapă o strategie de abordare pentru fundamentarea viitoarei procesări și utilizări a acestui tip de biomateriale, analizând extensiv tehnicile avansate de implementare pe plan mondial a copolimerilor resorbabili pe bază de acid polilactic în domeniul medical.

Ulterior analizei acestei baze de pornire și consolidare a unor procedee de lucru, demersul consecutiv a fost adresat conceperii unui model de studiu experimental animal, pe iepuri New Zealand, destinat stabilirii unei metode fiabile de testare a biomaterialului resorbabil Suprathel®, un material validat pentru vindecare tegumentară, transpus în condițiile cavității orale.

Acest studiu a dus la elaborarea cu succes a unui model animal precum și la constituirea unui ansamblu customizat de criterii validabile statistic, cu scale de măsură și punctaje cuantificabile, pentru evaluarea vindecării tisulare prin tehnica standard-de-aur, histologia, formând premisa pentru cel de-al treilea studiu, cel experimental pe lot animal.

Al treilea studiu a fost creat în scopul testării și evaluării în premieră pe modelul animal a biomaterialului Suprathel® pentru regenerarea tisulară orală ghidată (epitelială și, prin funcția sa de membrană, pentru regenerarea osului alveolar).

Prin rezultatul statistic, studiul pe lotul de 20 de iepuri a validat în comparația cu un material standardizat și validat clinic de o perioadă îndelungată, calitățile favorabile de regenerator pentru epiteliu și os ale copolimerului analizat.

A fost astfel posibilă emiterea de teze referitoare la îmbogățirea gamei de biomateriale orale cu acest valoros copolimer resorbabil, teze rezultate din studiile cuprinse în această cercetare a regenerării ghidate a țesuturilor orale - epitelial și osos.

În perioada actuală, în care materiale diverse sunt folosite pentru reconstrucția țesuturilor dure și moi ale organismului uman, cântărind și neajunsurile biomaterialelor neresorbabile existente, se poate întrevădea ca acidul polilactic și compușii săi să devină cele mai importante materiale de regenerare.

Pe scurt, avem probabil în față cel mai important biopolimer medical al viitorului.

SUMMARY OF THE PHD THESIS

Research on stimulation of oral guided tissue regeneration

PhD Student **Sergiu Vacaraș**

PhD Coordinator **Prof.dr. Grigore Băciuț**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

Table of contents

INTRODUCTION	13
CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	15
1.Principles of guided tissue regeneration	16
1.1. Introduction. Terminology	17
1.2. Tissue regeneration	18
1.3. Guided bone regeneration	18
1.4. Principles of guided bone regeneration	19
1.5. Materials used for guided tissue regeneration	21
1.6. Practical applications of guided tissue regeneration	23
2. Membranes used in guided tissue regeneration	25
2.1. Introduction	25
2.2. The role of membranes in GBR	26
2.2.1. <i>The ideal membrane</i>	26
2.2.2. <i>Barrier membrane properties</i>	27
2.2.3. <i>Membrane rigidity</i>	27
2.2.4. <i>Membrane's mechanical stability</i>	28
2.2.5. <i>Membrane's porosity and topography</i>	28
2.3. Types of membranes used in GBR	28
2.3.1. <i>Resorbable membranes</i>	29
2.3.1.1. <i>Collagen membranes</i>	30
2.3.1.2. <i>Synthetic resorbable membranes</i>	31
2.3.1.3. <i>Chitosan membranes</i>	33
2.3.1.4. <i>Gelatine membranes</i>	34
2.3.1.5. <i>Platelet concentrate membranes (PRP, PRGF and PRF)</i>	34
2.3.1.6. <i>Other types of resorbable membranes</i>	37
2.3.1.7. <i>Membrane resorption rate</i>	37
2.3.2. <i>Nonresorbable membranes</i>	38
2.3.2.1. <i>Polytetrafluoroethylene synthetic nonresorbable membranes (PTFE)</i>	39
2.3.2.2. <i>Titanium membranes</i>	40
2.3.2.3. <i>Silk membranes</i>	42
3. Techniques used in GTR for enhancing oral guided tissue regeneration	45
3.1. Combining GTR membranes with PRP for reconstruction of the apical and marginal bone defects. Comparative analysis	45
3.2. The use of grafts in GTR for covering root defects. Comparative result analysis	46
3.3. Combined techniques results	47
PERSONAL CONTRIBUTION	49
1. Working hypothesis and objectives	51
2. General method	53
3. Study no. 1. Fundamentals of medical use of resorbable, polylactide based composite and polymers. A review of clinical uses and their impact in GTR	55
3.1. Introduction	55
3.2. Working hypothesis	56
3.3. Materials and method	56
3.4. Results	57
3.4.1 <i>Historical context and production</i>	57
3.4.2 <i>Chemical and physical properties, clinical and metabolic impact of PLA</i>	58
3.4.3 <i>Stability and the factors that influence properties modifications</i>	59

3.4.4 <i>Industry, food industry, pollution of the environment</i>	61
3.4.5 <i>Biocompatibility</i>	62
3.4.6 <i>Animal studies</i>	63
3.5. Discussions	63
3.5.1. <i>Medical use. Composite's advantages</i>	63
3.5.2. <i>PLA and graphene-PLA nanocomposites</i>	64
3.5.3. <i>Medical domains</i>	72
3.5.4. <i>Resorbable osteosynthesis in maxillo-facial traumatology</i>	74
3.5.5. <i>Transport and targeting systems for drug delivery</i>	81
3.5.6. <i>Tissue engineering</i>	82
3.5.7. <i>Wound treatment: sutures, meshes, films, membranes, resorbable barriers</i>	83
3.6. Conclusions	86
4. Study no. 2. Pilot-study for developing an animal model for evaluating the efficiency of a material in GTR	89
4.1. Introduction	89
4.2. Working hypothesis	90
4.3. Materials and method	91
4.4. Results	96
4.4.1. <i>Oral mucosa healing</i>	96
4.4.2. <i>Bone healing</i>	102
4.5. Discussions	106
4.6. Conclusions	111
5. Study no. 3. First time validation of a polylactide copolymer in oral GTR: studying Suprathel® for oral GTR	113
5.1. Introduction	113
5.2. Working hypothesis	114
5.3. Materials and method	115
5.4. Results	123
5.5. Discussions	130
5.6. Conclusions	135
6. General conclusions	137
7. The originality and innovation of the thesis	139
REFERENCES	141

Key words: guided tissue regeneration; membranes; polylactic acid; biomaterials.

INTRODUCTION

Guided tissue regeneration represents an issue of great importance in the healing process of soft and hard tissues following various events (trauma, atrophy) that have contributed to their alteration. The traditional reconstruction techniques, using autologous grafts have multiple disadvantages, a fact that has led to the intensification of research efforts to obtain biocompatible materials capable of replacing these grafts.

Polylactic acid-based biomaterials (PLA) have a high potential in this regard, being biocompatible, soluble, but also having very good barrier properties. Polylactides and polylactic acid-based composites have a huge advantage in their resistance to microbial attack, because there are no enzymes that can destroy synthetic polymers. There is a real chance that polylactic acid and its compounds will advance to be among the most important materials used in guided tissue regeneration.

The present thesis aims to study, starting from the principles of guided tissue regeneration, the use of resorbable biomaterials based on copolymers of polylactic acid in oral guided tissue regeneration (epithelial and bone). A thorough analysis of the current literature on this topic was conducted. Afterwards, a biomaterial that had been already validated for skin healing (Suprathel®), was tested and evaluated for the first time in an animal pilot study, for guided oral tissue regeneration. Initially, a pilot study was conducted, followed by a larger, split-mouth, animal-based study (20 rabbits) in which the efficacy of Suprathel® as a barrier membrane in guided tissue regeneration was assessed using histological analysis.

CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

This section of the paper presents general aspects of the principles of guided tissue regeneration, including the terminology, biological principles of bone and soft tissue regeneration and especially materials used in clinical applications.

Membranes used in guided tissue regeneration are described in detail in terms of ideal properties, as well as the physical and biological properties. The second chapter of this part also presents a classification of membranes (resorbable and non- resorbable) as well as their advantages and disadvantages.

The last chapter of the first part of the thesis refers to the techniques used in guided tissue regeneration, especially in the oral cavity and to combined techniques that aim to obtain optimal results.

PERSONAL CONTRIBUTION

The broadest section of the thesis contains the personal contributions of the doctoral student in the form of three studies regarding the development of guided tissue regeneration techniques and especially of materials used as a barrier in guided tissue regeneration. These three studies which are included, describe the methodology and results of the research. The objectives of the papers are staged in three phases as follows: a first phase aims to analyze the areas of medical applicability of resorbable copolymers with capacities to stimulate tissue regeneration and substantiate the classification of polymers of polylactic acid copolymers. The second phase involves the design and validation of an animal model in a pilot study, where the concept is validated and a customized scale of criteria for evaluating tissue healing is developed. The ultimate goal is to verify the barrier qualities in guided tissue regeneration of Suprathel®, by using an animal split-mouth model that included 20 rabbits. The results were compared to a standardized material, already in use for this purpose.

Study no. 1. Fundamentals of medical use of resorbable, polylactide based composite and polymers. A review of clinical uses and their impact in GTR

Polylactic acid (PLA) is an aliphatic polyester. It is currently widely used in multiple fields. PLA has physical, chemical and mechanical properties that make it an ideal candidate for the manufacture of specific absorbable medical devices and for its use in the food industry. It is the ideal biomaterial for medical use due to its complete decomposition into water and carbon dioxide in the human body. It is a bioplastic biomaterial, being derived from biomass and not being based on non-renewable oil reserves. It is versatile and results from a non-polluting manufacturing process.

The present study aimed at substantiating and providing a comparative evaluation of the most important areas of medical uses, as well as describing the biological impact of polylactides and lactide-based composites.

An extensive research of the literature was undertaken in order to aim at the final goal of the present doctoral thesis.

A structured electronic research was conducted on the use of polylactide-based compounds, which included the Pubmed and Web of Science databases as well as other sources from which the relevant articles were selected.

The results of this study reveal interesting aspects regarding the evolution of materials based on polylactic acid, highlight physico-chemical and biological properties that make them ideal for medical applications and present factors that influence the behavior of these biomaterials. PLA's biocompatibility is noteworthy in both in vitro and in vivo studies.

The discussion chapter analyzes the advantages such as: high processability, excellent barrier properties and thermal properties. Studies aimed at improving the mechanical properties as well as the thermal and hydrolysis resistance of PLA polymers but also the potential for practical implementation of PLA nanocomposites and graphene-PLA nanocomposites are discussed. The rest of the discussion chapter follows into detail the medical applications and the advantages that PLA provides in this field, especially in the oral and maxillofacial field, in guided tissue regeneration and in traumatology.

Poly lactides are also being presented as drug transport systems (theranostics, targeted specific therapy, combined with targeted diagnosis), among hydrophilic polymers (polyvinyl pyrrolidone, poly 2 hydroxyethyl methacrylate and polyvinyl alcohol), hydrophobic polymers (ethylene copolymers), vinyl acetate, polydimethylsiloxanes) and biodegradable polymers (polylactides, polyglycolic acid, polycaprolactone, polyalkyl-cyanacrylates and polylactic-co-glycolic acid). The combination of poly-epsilon-caprolactone (PCL) with polylactic acid to obtain modified polymers is also intensively studied.

Poly lactides and their composites also have all the properties that give them the status of ideal material for tissue engineering (biocompatibility, adequate porosity, mechanical strength, to protect the structure and content of pores over time, biodegradability).

The conclusions of this first study note that PLA and its copolymer-based composites with superior metabolic characteristics to other biomaterials will gain supremacy in many areas. The promising uses of PLA in the medical and pharmaceutical fields are demonstrated (tissue engineering, bone fixation, injury treatment and drug transport system). PLA and its composites represent a real green alternative for biomaterials, including the terms of the ecological fabrication process. PLAs have the potential to become the most important medical biopolymer of the future.

Study no. 2. Pilot-study for developing an animal model for evaluating the efficiency of a material in GTR

Guided tissue regeneration (GTR) is a widely used technique in oral and maxillofacial surgery, dentistry and especially in implantology. The presence and characteristics of the keratinized oral mucosa are key aspects for ensuring oral health conditions. Bone is the second most transplanted tissue, preceded only by blood, thus guided bone regeneration plays a priority role in regeneration research. This second study was designed to evaluate the performance of a clinically validated material for skin regeneration, namely Suprathel® (Polymedics Innovations, Denkendorf, Germany), this time as a barrier membrane in the regeneration of oral tissues. In this study, Suprathel® is compared with Mucoderm® (Botiss Biomaterials GmbH, Zossen, Germany), a material that was chosen as a reference due to its common and widespread use in GTR.

We started from the hypothesis that a split-mouth animal model would be useful in order to evaluate the membrane capacities of the Suprathel® polylactide copolymer. In this sense, a pilot study was performed on two New Zealand rabbits. The study was conducted in the Biobase of the University of Medicine and Pharmacy "Iuliu Hațieganu" in Cluj-Napoca. To evaluate the epithelial healing capacity provided by the materials, the mucosal defects were planned and created bilaterally under general anesthesia, in the vestibular groove of each rabbit, according to a split-mouth model. The plasty to cover the mucosal defects was performed with the help of the two materials, applied on each side. To assess bone healing, the interventions involved bilateral extractions of

two maxillary premolars on each side as well as a molar on one side. The alveoli were covered consecutively with the tested materials, applied on both premolar alveoli located on each of the contralateral maxillary parts. The molar alveolus was used as a reference (control) and left uncovered for spontaneous healing. The statistical analysis of the histological investigation was performed by a customized set of statistically validated criteria, with measurement scales and quantifiable scores, specially constituted in a set created in this study, for the evaluation of tissue healing by histology, the gold-standard technique (Likert scale).

The results of this study show good healing for both tested materials and describe the histological aspects of healing, both for epithelium and bone. The discussion chapter includes a comparison of the results of this pilot study with other similar studies from the literature, on similar materials, conducted in the past. The widespread and particular benefits of PLA in the medical field are also discussed.

The conclusion of this study notes that the split-mouth animal model is validated for Suprathel® (or other similar materials) testing. Also, the criteria for the statistical evaluation of a larger batch of animals can support a statistical analysis. The examined material has a high potential for success in intraoral GTR, due to its structure and properties (easy application, increased thickness and mechanical strength). The experimental model proved to be very versatile and solved the problems in this testing phase, providing a strong basis for its continuation in a larger experiment, for sustainable results.

Study no. 3. First time validation of a polylactide copolymer in oral GTR: studying Suprathel® for oral GTR

Oral tissue regeneration is a sophisticated combination of intricate processes that occur continuously depending on age, pathological damage to the gums and bone, trauma and tooth loss. The functional and anatomical significance of the regions involved is very high, the deficiency can range from minor to significant and even affect the patient's overall life quality. Alveolar bone atrophy due to tooth loss is obvious both clinically and with imaging methods and poses serious difficulties in the treatment of edentulous patients. Postextractional alveolar preservation procedures have been studied and implemented for a long time. However, there is still no consensus on the best method of preserving the alveolar bone. The ideal characteristics of barrier membranes used in such cases should be: biocompatibility, barrier function, ensure absence of local inflammation, host integration, clinical maneuverability, space-maintaining capabilities and providing specific tissue healing conditions. In addition to bone atrophy, the absence of attached keratinized mucosa was linked to hygienic discomfort and reduced vestibular depth.

The aim of this last study was to investigate the effectiveness of Suprathel® in oral tissue regeneration and to stimulate innovative research to improve oral tissue regeneration. Twenty New Zealand rabbits from the "Iuliu Hațieganu" University of Medicine and Pharmacy in Cluj-Napoca were used for this study. The study was randomized and performed in a double-blind regime. Mucosal defects in the size of 5 x 5 mm were created bilaterally in the superior anterior vestibule, in the oral cavity of all 20 rabbits for the evaluation of epithelial healing and for the evaluation of bone healing. The bilateral extraction of two maxillary premolars on each side was performed as well and that of a molar on one side. A specially manufactured, double-thickness Suprathel® membrane (250 microns thick from Polymedics Innovations, Denkendorf, Germany) was compared with a commercially available Mucoderm® membrane (Botiss Biomaterials GmbH, Zossen, Germany).

Histological coloration was performed with hematoxylin-eosin and according to the trichrome-Masson technique. All the slides were examined by a histopathologist with 25 years of experience in assessing guided oral tissue regeneration. The evaluation process was planned based on the criteria set out in the previous pilot study.

The results of the study show that no significant differences were found between Mucoderm® and Suprathel® with respect to any of the alveolar bone healing characteristics quantified by Likert scores in this study. Both Mucoderm® and Suprathel® showed significantly higher Likert scores compared to the naturally healing alveolus. Epithelialization occurred in the cases of both materials. Epithelial healing with hyperkeratosis

prone to hyperkeratosis with orthokeratosis was found to be more pronounced for Mucoderm® and lower for Suprathel®.

The discussion chapter analyzes the significance of the results, both in terms of the potential for clinical application and for future research directions. Suprathel®, the polylactic acid copolymer with poly-epsilon-caprolactone and trimethylene carbonate displays significant advantages in use: adheres closely and adapts to the wound surface. It should not be changed or removed and separates from the wound surface as the latter epithelializes. Both Suprathel® and Mucoderm®, a material used specifically in oral GTR, gave good results in this test, both yielded results superior to spontaneous healing. The results of the study are compared with other articles on similar topics in the literature, however there is no other study with a similar design and using the same materials.

In conclusion, this study carried out the first validation of Suprathel® (a resorbable material, already used successfully for skin regeneration), as a versatile and effective material for regenerating epithelium and, through its membrane function, bone tissue in the oral cavity. The results of this study pave the way for future clinical trials, which could further investigate the clinical use of this very promising procedure for guided regeneration of tissues and bone in the oral cavity, adding a very useful and versatile material to existing therapeutic means.

GENERAL CONCLUSIONS

The present thesis started from understanding the principles of guided tissue regeneration and undertook research on the extension of the use of resorbable biomaterials based on copolymers of polylactic acid in oral epithelial and bone regeneration.

To this end, in the first stage, an approach strategy was established to substantiate the future processing and use of this type of biomaterials, extensively analyzing advanced techniques for the global implementation of resorbable copolymers based on polylactic acid in the medical field.

Following the analysis of this basis for starting and consolidating some work procedures, the consecutive approach was addressed to the design of an experimental animal study model, on New Zealand rabbits, designed to establish a reliable method for testing the absorbable biomaterial Suprathel®, a validated material for skin healing, transposed in the conditions of the oral cavity.

This study led to the successful elaboration of an animal model as well as to the establishment of a customized set of statistically provable criteria, with measurement scales and quantifiable scores, for the evaluation of tissue healing by the golden standard technique, histology. This way the premise for the third study, double blind, split-mouth, animal model was established.

The third study was a premiere for testing and evaluation of Suprathel® in guided oral tissue regeneration (epithelial and, through its membrane function, for alveolar bone regeneration).

By the use of statistical analysis, this study certified the favorable properties as a regenerator for both epithelium and bone of the analyzed copolymer in comparison with a standardized and clinically verified material.

It was thus possible to issue a thesis on the enrichment of the range of oral biomaterials with this valuable resorbable copolymer. In current times, in which various materials are used for the reconstruction of hard and soft tissues of the human body, considering the shortcomings of the existing non-absorbable biomaterials, it could be shown that the compounds of polylactic acid may join the group of the most important regenerating materials.

In short, we might be standing before the most promising medical biopolymer of the future.