
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Reconstrucția și regenerarea osoasă în sfera oaselor maxilare în corelație cu osteonecroza pe fond de bisfosfonați

Doctorand **Andreea Elena Lungu (Miron)**

Conducător de doctorat Prof.dr. **Mîndra Eugenia Badea**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

Cuprins

INTRODUCERE	Error! Bookmark not defined.	5
STADIUL ACTUAL AL CUNOASTERII		
1. Osteonecroza oaselor maxilare	Error! Bookmark not defined.	9
1.1 Prevalență și incidență:	Error! Bookmark not defined.	
1.2 Factori implicați în declanșarea BRONJ	Error! Bookmark not defined.	
1.2.1 Factori de risc	Error! Bookmark not defined.	
1.2.2 Factori favorizanți generali	Error! Bookmark not defined.	
1.2.3 Factori favorizanți locali	Error! Bookmark not defined.	
1.2.4 Factori trigger	Error! Bookmark not defined.	
1.3 Etiopatogeneză	Error! Bookmark not defined.	
1.4 Tablou clinic	Error! Bookmark not defined.	
1.5 Investigații imagistice	Error! Bookmark not defined.	
1.5.1 Radiografiile bidimensionale	Error! Bookmark not defined.	
1.5.2 Scintigrafia osoasă	Error! Bookmark not defined.	
1.5.3 Cone Beam Computered Tomography (CBCT)	Error! Bookmark not defined.	
defined.		
1.5.4 Single Photon Emission Computered Tomography (SPECT)	Error!	Error!
Bookmark not defined.		
1.5.5 Rezonanța Magnetică Nucleară (RMN)	Error! Bookmark not defined.	
1.6 Metode preventive	Error! Bookmark not defined.	
1.7 Tratament	Error! Bookmark not defined.	
1.7.1 Tratament conservativ	Error! Bookmark not defined.	
1.7.2 Tratament chirurgical	Error! Bookmark not defined.	
1.8 Metode reconstructive postrezective	Error! Bookmark not defined.	
1.8.1 Reconstrucția microchirurgicală	Error! Bookmark not defined.	
1.8.2 Reconstrucția osoasă cu ajutorul biomaterialelor aloplastice	Error!	Error!
Bookmark not defined.		
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ		50
1. Ipoteză de lucru/obiective	Error! Bookmark not defined.	
2. Metodologie generală	Error! Bookmark not defined.	
3. Studiul 1. Studiu observațional al osteonecrozei oaselor maxilare pe fond de tratament cu bisfosonați	Error! Bookmark not defined.	

3.1	Introducere	Error! Bookmark not defined.
3.2	Ipoteză de lucru	Error! Bookmark not defined.
3.3	Material și metodă	Error! Bookmark not defined.
3.4	Rezultate	Error! Bookmark not defined.
3.5	Discuții	Error! Bookmark not defined.
3.6	Concluzii	Error! Bookmark not defined.
4.	Studiul 2. Biomaterial antimicrobian nou pentru reconstrucția defectelor craniofaciale	Error! Bookmark not defined.
4.1	Introducere	Error! Bookmark not defined.
4.2	Ipoteză de lucru	Error! Bookmark not defined.
4.3	Material și metodă	Error! Bookmark not defined.
4.4	Rezultate	Error! Bookmark not defined.
4.5.	Discuții	Error! Bookmark not defined.
4.6.	Concluzii	Error! Bookmark not defined.
5.	Studiul 3. Studiu preliminar de eliberare a ocitocinei <i>in vitro</i> din noul material aloplastic polidioxanonă-pluronic 127 impregnat cu ocitocină	Error!
	Bookmark not defined.	
5.1	Introducere	Error! Bookmark not defined.
5.2	Ipoteză de lucru	Error! Bookmark not defined.
5.3	Material și metodă	Error! Bookmark not defined.
5.4	Rezultate	Error! Bookmark not defined.
5.5.	Discuții	Error! Bookmark not defined.
5.6.	Concluzii	Error! Bookmark not defined.
6.	Studiul 4. Analiza caracteristicilor de suprafață și a biostimulării citologice a meșelor poroase polimerice și compozite impregnate cu ocitocină	Error!
	Bookmark not defined.	
6.1	Introducere	Error! Bookmark not defined.
6.2	Ipoteză de lucru	Error! Bookmark not defined.
6.3	Material și metodă	Error! Bookmark not defined.
6.4	Rezultate	Error! Bookmark not defined.
6.5	Discuții	Error! Bookmark not defined.
6.6	Concluzii	Error! Bookmark not defined.
7.	Discuții generale	Error! Bookmark not defined.
8.	Concluzii generale	Error! Bookmark not defined.
9.	Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	Error! Bookmark not defined.

REFERINȚE

Error! Bookmark not defined.

Cuvinte cheie: osteonecroza maxilarului legata de bifosfonati, compozite armate cu fibre, gentamicina, polidioxanona, pluronic 127, oxitocina,

Stadiul actual al cunoașterii

Afecțiunile degenerative și oncologice care vizează țesutul osos răspund favorabil terapiei antiresorbtive adresată reducerii funcției osteoclastelor. Însă, expunerea organismului la tratamentul cu bisfosonați (clasă din medicația antiresorbtivă) pentru o perioadă mai îndelungată de 2 ani, crește riscul dezvoltării complicațiilor specifice datorită acumulării acestora la nivel osos.

În regiunile cu vascularizație redusă, dar și în zonele expuse presiunilor rezultate din parafunții, instabilitate a pieselor protetice, suprasolicitare ocluzală, metabolismul osos alterat prin lipsa capacității de remodelare duce la necrozarea osului. Cu toate acestea, principial, factorul declanșator al osteonecrozei oaselor maxilare expuse tratamentului cu bisfosonați este reprezentat de extracția dentară urmată de inserția de implanturi dentare și oricare alte intervenții chirurgicale asupra osului maxilar.

Tratamentul BRONJ vizează înlăturarea osului necrotic și restabilirea continuității osoase cu obținerea vindecării clinice și radiologice. În funcție de dimensiunea defectului postoperator, ca metode de refacere a conturului osos se poate opta pentru reconstrucție sau regenerare osoasă.

Metodele reconstructive presupun înlocuirea segmentului osos excizat cu un substituent autolog cum sunt lambourile libere fibular, scapular, de creastă iliacă sau de antebraț, sau alogen, optând pentru materialul care poate satisface optim necesitățile morfofuncționale ale situsului de reconstruit.

Materialele anorganice sintetice cum sunt bioceramicile, hidroxiapatita și β tricalciu fosfat, preparate sub formă de piese de volum major, ca cele necesare reconstrucțiilor segmentare de mandibulă, sunt susceptibile la fractură și contraindicate în acest scop. În schimb biosticlele sub formă de nanoparticule, sunt recunoscute pentru puternicul stimul osteoregenerativ oferit osului osteoporotic, prin creșterea alcalinității mediului interstițial care stimulează angiogeneza, diferențierea celulelor multipotente pe linie osteoblastică și încetinirea dezvoltării progenitorilor osteoclastici.

Materialele organice naturale cum sunt colagenul, matricea osoasă demineralizată și plasma bogată în fibrină obțin rezultate favorabile în combinații cu alți polimeri sau constituenți anorganici care cresc rezistența produsului final. Resorbția rapidă reduce indicațiile polimerilor naturali la defecte minore cu posibilitate de imobilizare facilă a grefei.

Polimerii sintetici oferă un areal de posibilități atât în domeniul reconstrucției cât și în cel al regenerării osoase. Rețeaua polimerică poate fi ordonată arhitectural astfel încât produsul finit să prezinte o rezistență în concordanță cu cea a osului de reconstruit prin tehnici ca melt molding, electrospinning sau printare 3D, sau poate lua forma unei schele poroase osteoconductive obținută prin electrospinning sau dispunere interfacială. Caracterul puternic hidrofob observat în cazul polidioxanonei și lipsa potențialului osteoinductiv fac necesară combinarea polimerilor sintetici cu materiale anorganice sau polimeri naturali în vederea obținerii unui biomaterial regenerativ.

Necesitatea biostimulării se impune în cazul defectelor uzuale astfel ca materialul adiționat să fie înlocuit de os nou conform funcțional cu cerințele locale. În acest sens sunt utilizați frecvent compuși ca bone marrow proteins, factori de creștere, hormoni cu efect anabolic osos precum ocitocina.

Organismul tarat al pacientului suferind de osteonecroză a oaselor maxilare pe fond de bisfosfonați se luptă greu cu agresiunile externe. Din acest considerent capacitatea de eliberare constantă și continuă a unui antibiotic din matricea unui implantului durabil și rezistent precum cel pe bază de compozit ramforsat cu fibră de sticlă, protejează țesuturile grefate de invazia bacteriană, consolidând șansele de integrare și de bună funcționare a piesei reconstructive.

Ipoteză de lucru/obiective

Dezvoltarea BRONJ reprezintă complicația unui tratament agresiv aplicat unei patologii de fond care afectează capacitatea de apărare și regenerare a organismului. Reconstrucția în urma exciziei osului necrozat întâmpină dificultăți majore datorate acestor deficiențe. În acest context, atribuirea de noi constituenți materialelor de reconstrucție și de adiție care să asigure protecție antibacteriană și biostimulare, crește exponențial șansele de reușită.

Perfecționarea unui implant osos compus din rășină acrilică cu monomerii Bis-GMA, UDMA și PMMA ramforsată cu fibră de sticlă, prin inserarea în întreaga sa compoziție a gentamicinei, antibiotic cu eficiență superioară asupra bacteriilor patogene cu afinitate osoasă, asigură condiții aseptice în perioada de integrare a implantului, și implicit reușita terapiei reconstructive.

Pentru stimularea celularității țesutului grefat, materialul de adiție mimează matricea osoasă, prezentându-se sub forma unei schele cu dimensiuni ale spațiilor libere cuprinse între 50-100 μ , conține constituenți specifici substanței anorganice precum hidroxiapatita, β tricalciu fosfat, și eliberează substanțe chemotactice precum heparina și ocitocina care vor asigura transformarea materialului adiționat în os nou. Cu un puternic efect anabolic osos, ocitocina promovează migrarea și ulterior adeziunea osteoblastelor în materialul adiționat. La rândul său, matricea polimerică se degradează în ritmul vindecării osoase, eliberând pe măsura resorbției, ocitocina și heparina înmagazinată. Folosirea a doi polimeri, polidioxanona hidrofobă și pluronicul hidrofil,

conferă amestecului rezistență, stabilitate volumetrică la momentul inserției, biocompatibilitate, resorbție lentă prin hidroliză.

Studiul 1. Studiu observațional al osteonecrozei oaselor maxilare pe fond de tratament cu bisfosfonați

Prima cercetare se concentrează asupra caracteristicilor BRONJ evidențiate printr-un studiu retrospectiv la care au fost incluși 20 de pacienți ai Clinicii de Chirurgie Orală și Maxilo-Facială din Cluj-Napoca.

Criteriile de includere au fost semnele patognomonice ale BRONJ. Scopul acestui studiu a fost acela de a analiza caracteristicile statistice, clinice și paraclinice, precum și tratamentul osteonecrozei oaselor maxilare pe fondul administrării de bisfosfonați. Rezultatele obținute, au fost comparate cu cele ale studiilor asemănătoare desfășurate anterior.

Singurele oase ale scheletului uman care au raport relativ cu exteriorul sunt reprezentate de oasele maxilare care prin intermediul spațiului parodontal comunică cu cavitatea orală, această condiție, crescând susceptibilitatea la infecții osoase. Circulația de tip terminal și efectul antiangiogenetic al bisfosfonaților explică predispoziția oaselor maxilare la osteonecroză, mai cu seamă a mandibulei. Studiul de față a observat o prevalență a afectării mandibulare de 55%, asemănătoare cu cea rezultată din studiul lui Filleul (65%) și cu cea găsită de Beniatti (raport de afectare mandibulă-maxilar 2:1).

95% din cazurile de osteonecroză a maxilarelor, au debutat în urma extracției dentare, iar un singur caz s-a datorat leziunilor de decubit determinate de instabilitatea protezei totale. Cauzalitatea se explică prin reducerea capacității de vindecare a mucoasei orale cu expunerea consecutivă a alveolei postextractionale.

Majoritatea leziunilor osteonecrotice s-au dezvoltat la pacienții cărora li s-a administrat bisfosfonatul intravenos, dar s-a observat întârzierea vindecării postextractionale fără declanșarea osteonecrozei, în cazul pacienților ce au primit bisfosfonați orali pe termen lung. Studiile axate pe descoperirea factorilor determinanți ai osteonecrozei, au sesizat synergismul între micromediul înconjurător osului în curs de vindecare și factori generali cum ar fi corticoterapia. Prezența concomitentă a unei boli autoimune crește semnificativ șansele de dezvoltare a BRONJ. De asemenea, asocierea terapiei antiresorbtive cu afectare pancreatică de tip diabet zaharat, crește riscul dezvoltării BRONJ.

Ca și tratament inițial, leziunile osteonecrotice au fost supuse sechestrectomiei (75%), numai 25 de procente necesitând doar lavaje cu soluții antiseptice. În ceea ce privește terapia antibiotică asociată tratamentului chirurgical, în studiul de față, a primit amoxicilină cu acid clavulanic (40%), asemănător cu terapia aplicată în studiul lui Filleul, unde ampicilina a fost administrată în 39% din cazuri.

Studiul de față realizează o expunere detaliată a celor mai importanți indicatori clinici de evoluție a BRONJ și a tratamentului chirurgical al acesteia, precum și al reușitei terapeutice coroborată cu stadiul evolutiv al patologiei.

Limitele acestei cercetări sunt impuse tocmai de modul retrospectiv de culegere a datelor, care modifică prin nota de subiectivism claritatea informației.

Studiul 2. Biomaterial antimicrobian nou pentru reconstrucția defectelor craniofaciale.

În cercetările anterioare, au fost dezvoltate și caracterizate compozite pe bază de polimetil metacrilat, bisfenol A-glicidil metacrilat, trietilen glicol dimetacrilat, armate cu fibră de sticlă tip E, destinate implanturilor craniofaciale personalizate al căror strat superficial rășinic elibera constant gentamicină pentru o perioadă de două săptămâni. Din necesitatea de a asigura o perioadă mai lungă de protecție antibiotică a situsului reconstruit, s-a propus și testat în cadrul lucrării de față înglobarea gentamicinei în întreaga masă a implatului.

Ideal, în timpul reacției de polimerizare, întregul conținut de monomer se leagă în rețeaua polimerică. Polimerizarea completă în cazul rășinilor acrilice este relativă, o cantitate monomerică redusă nu reacționează și rămâne parțial prinsă în matricea polimerică.

Eforturile de minimalizare a cantității de monomer rezidual sunt justificate, dat fiind faptul că Bis-GMA și TEGDMA precum și alți monomeri metacrilici s-au dovedit geno și citotoxici în contact direct cu țesutul gazdă. Există studii care subliniază efectul alergic al monomerilor metacrilici. S-a demonstrat că extracția continuă a monomerului rezidual după polimerizarea procesată complet poate altera proprietățile materialului, inclusiv elasticitatea, rezistența mecanică și durata de viață.

În studiul de față, s-au testat trei solvenți organici (75% alcool etilic, acetonă și cloroform) căutând cea mai eficientă soluție în ceea ce privește eliberarea completă a monomerilor reziduali după cea mai scurtă expunere la solvent (tratament de mai puțin de 8 ore). Rezultatele subliniază că rășinile pe bază de Bis-GMA stocate în acetonă sau cloroform pentru a elibera monomerul rezidual, prezintă cel mai mic risc de a provoca o reacție de corp străin datorată eliberării monomerului remanent.

În urma expunerii la solvent, suprafața probelor a fost examinată prin microscopie electronică cu scanare (SEM) și s-au constatat alterări ale suprafeței cu apariția de fisuri și macropori în cazul folosirii cloroformului ca solvent. În schimb, tratarea probelor cu acetona sau alcool etilic a prezervat textura de suprafață.

Eliberarea controlată de antibiotice este una din abordările propuse și testate pentru dezvoltarea de caracteristici antibacteriene materialelor implantate. FRC-urile investigate au matrici polimerice tridimensionale reticulate nedegradabile, eliberarea gentamicinei fiind realizată în principal prin difuziune. Cantitatea de gentamicină eliberată din FRC a fost influențată de natura și densitatea rețelei reticulate, cât și de timpul de stocare. Prin tratament termic, crește conversia legăturilor duble, precum și reticularea polimerului și, în consecință, o cantitate mai mică de gentamicină poate fi extrasă din rețeaua de polimeri.

Eluarea antibioticului din implant este limitată în timp cu toate acestea, integrarea gentamicinei în toată masa piesei, asigură protecție antibacteriană până în momentul osteointegrării care se poate extinde până la 12 săptămâni.

Studiul 3. Studiu preliminar de eliberare a ocitocinei in vitro din noul material aloplastic polidioxanonă-pluronic 127

Regenerarea osoasă necesită prezența simultană a caracteristicilor cheie care duc la obținerea de volumului de os necesar. În acest sens, am ales utilizarea a doi polimeri resorbabili, biocompatibili, pentru a crea o rețea cu caracter osteoconductiv.

Polidioxanona reprezintă un polimer versatil ce poate sta la baza biostructurilor de diferite densități și durități, datorită ușurinței de manipulare.

Prin depunere interfacială, rețeaua polimerică rezultată prezintă spații uniform distribuite care facilitează legarea stabilă, în toată masa meșei a biomoleculei transportate și a constituentului anorganic (hidroxiapatita și tricalciu fosfat). Prezența lucrare obține meșe afânate a căror rețea polimerică biodegradabilă, eliberează ocitocina înmagazinată pe măsura resorbției prin hidroliză.

Utilizarea ocitocinei în contextul regenerării osoase și-a dovedit utilitatea prin studii pe animale de experiență cu osteoporoză indusă. Perfecționarea unui sistem de eliberare locală a ocitocinei în domeniul regenerării osoase, a dus la dezvoltarea unor compozite polimerice sub formă de nanoparticule sau meșe, care au obținut rezultate superioare din punctul de vedere al volumului de os câștigat, în comparație cu loturile martor, neîncărcate cu ocitocină. Studiul de față a obținut un produs sub formă de meșă care, adițional caracterului osteoconductiv asigurat de rețeaua polimerică, stimulează funcția osteoblastică prin intermediul ocitocinei.

Analizată prin microscopie electronică, aspectul matricii PDO-PLU-HA este unul mozaical omogen, cu dispersia uniformă a componentelor matricii, respectând aceleași proporții pe întreaga suprafață. Porozitatea matricii polimerice, cuprinsă în intervalul 20 și 100 μm , facilitează migrarea celulelor endoteliale în structura matricii și crearea de vase de neoformație. Cristalele de hidroxiapatită uniform dispersate promovează chemotactismul celulelor osteoformatoare.

Prin intermediul cromatografiei de înaltă rezoluție s-a constatat strânsa legătură dintre ocitocină și polidioxanonă care împiedică eliberarea hormonului în absența resorbției polimerului. În acest context, în perioada imediată postgrefare cantitatea de ocitocină prezentă în mediu nu este suficientă pentru activarea celulară specifică hormonului.

Pentru a facilita eliberarea ocitocinei, s-a propus integrarea heparinei ca element de legătură între polidioxanonă și hormon după metoda lui Kim et al.

Studiul 4. Analiza caracteristicilor de suprafață și a biostimulării citologice a meșelor poroase polimerice și compozite impregnate cu ocitocină

Utilizarea heparinei ca liant între ocitocină și matricea polimerică a dus la eliberarea hormonului în parametri optimi pentru stimularea celulară scontată. Astfel, cantitatea de ocitocină din mediu, nu a atins limita citotoxică și s-a încadrat în intervalul biostimulator pe toată perioada monitorizării pentru toate cele 4 probe din studiu. Intervalul optim de eliberare s-a observat în cadrul meșelor polimerice pe bază de polidioxanonă, urmate îndeaproape de meșa tricalciu fosfat – chitosan.

Meșele poroase rezultate din actuala cercetare, au proprietatea de mimetism tisular datorită rețelei polimerice asemănătoare matricei osoase și a conținutului anorganic de hidroxiapatită și fosfat tricalcic, substanțe specifice țesutului osos. Acest aspect s-a dovedit susținător al vitalității celulare în studiul *in vitro* pe fibroblaști umani. De asemenea, cele mai bune rezultate au fost prezentate de cele două meșe ce au în componență polidioxanonă.

Studii ulterioare vor avea în vedere îmbunătățirea proprietăților mecanice ale meșei polidioxanonice, cu creșterea rigidității mărind astfel plaja de defecte reconstruibile.

ABSTRACT OF THE DOCTORAL THESIS

Bone reconstruction and regeneration in the jaw region in correlation with osteonecrosis related to bisphosphonates

Doctoral candidate **Andreea Elena Lungu (Miron)**

Doctoral supervisor Prof.dr. **Mîndra Eugenia Badea**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

Table of content

INTRODUCTION	Error! Bookmark not defined.	5
CURRENT STATE OF KNOLEDGE		
1. Osteonecrosis of the jaw bone	Error! Bookmark not defined.	9
1.1 Prevalence and incidence:	Error! Bookmark not defined.	
1.2 Implicated factors in Bronj onset	Error! Bookmark not defined.	
1.2.1 Risc factors	Error! Bookmark not defined.	
1.2.2 General favoring factors	Error! Bookmark not defined.	
1.2.3 Local favoring factors	Error! Bookmark not defined.	
1.2.4 Trigger factors	Error! Bookmark not defined.	
1.3 Ethioptogenesis	Error! Bookmark not defined.	
1.4 Clinical sings and symptoms	Error! Bookmark not defined.	
1.5 Imagistic evaluations	Error! Bookmark not defined.	
1.5.1 Bidimensional radiology	Error! Bookmark not defined.	
1.5.2 Bone scintigraphy	Error! Bookmark not defined.	
1.5.3 Cone Beam Computered Tomography (CBCT)	Error! Bookmark not defined.	
defined.		
1.5.4 Single Photon Emission Computered Tomography (SPECT)	Error!	Error!
Bookmark not defined.		
1.5.5 Magnetic Rezonance Imaging (MRI)	Error! Bookmark not defined.	
1.6 Prevention methods	Error! Bookmark not defined.	
1.7 Treatment	Error! Bookmark not defined.	
1.7.1 Concervatory treatment	Error! Bookmark not defined.	
1.7.2 Surgical treatment	Error! Bookmark not defined.	
1.8 Reconstructive methods after bone resection	Error! Bookmark not defined.	
defined.		
1.8.1 Microsurgical reconstruction	Error! Bookmark not defined.	
1.8.2 Alloplastic materials bone reconstruction	Error! Bookmark not defined.	
defined.		
PERSONAL CONTRIBUTION		50
1. Hypothesis	Error! Bookmark not defined.	
2. General methodology	Error! Bookmark not defined.	

3. Study 1. Oservational study of the bisphosphonate related osteonecrosis of the jaw	Error! Bookmark not defined.
3.1 Introduction	Error! Bookmark not defined.
3.2 Hypothesis/objectives	Error! Bookmark not defined.
3.3 Material and method	Error! Bookmark not defined.
3.4 Results	Error! Bookmark not defined.
3.5 Discussions	Error! Bookmark not defined.
3.6 Conclusions	Error! Bookmark not defined.
4. Study 2. Novel antimicrobial biomaterial for craniofacial bone reconstruction	Error! Bookmark not defined.
4.1 Introduction	Error! Bookmark not defined.
4.2 Hipothesis/objectives	Error! Bookmark not defined.
4.3 Material and method	Error! Bookmark not defined.
4.4 Results	Error! Bookmark not defined.
4.5. Discussions	Error! Bookmark not defined.
4.6. Conclusions	Error! Bookmark not defined.
5. Study 3. Preliminary study of in vitro release of oxitocin from the novel alloplastic material polydioxanone-pluronic 127 based	Error! Bookmark not defined.
5.1 Introduction	Error! Bookmark not defined.
5.2 Hypothesis/objectives	Error! Bookmark not defined.
5.3 Material and method	Error! Bookmark not defined.
5.4 Results	Error! Bookmark not defined.
5.5. Discussions	Error! Bookmark not defined.
5.6. Conclusions	Error! Bookmark not defined.
6. Study 4. Surface characteristics and cytological biostimulation analysis of the polymeric and composite porous meshes impregnated with oxytocin	Error! Bookmark not defined.
6.1 Introduction	Error! Bookmark not defined.
6.2 Hypothesis/objectives	Error! Bookmark not defined.
6.3 Material and method	Error! Bookmark not defined.
6.4 Results	Error! Bookmark not defined.
6.5 Discussions	Error! Bookmark not defined.
6.6 Conclusions	Error! Bookmark not defined.
7. General discussions	Error! Bookmark not defined.
8. General conclusions	Error! Bookmark not defined.

9. Originality and thesis innovative contributions Error! Bookmark not defined.

REFERINȚE

Error! Bookmark not defined.

Key words: bisphosphonate related osteonecrosis of the jaw, fiber reinforced composites, gentamicin, polydioxanone, pluronic 127, oxitocin,

Current state of knowledge

Degenerative and oncological diseases targeting bone tissue respond favorably to antiresorptive therapy aimed at reducing the function of osteoclasts. However, exposure of the body to bisphosphonate treatment (class of antiresorptive medication) for a longer period of 2 years increases the risk of developing specific complications due to their accumulation in the bone.

In regions with reduced vascularity, but also in areas exposed to pressure resulting from parafunctions, instability of prosthetic dentures, occlusal overload, altered bone metabolism due to lack of remodeling capacity leads to bone necrosis. However, the most common trigger for osteonecrosis of the jaw bones exposed to bisphosphonate treatment is tooth extraction followed by the insertion of dental implants and any other surgery on the jaw bone.

BRONJ treatment aims to remove necrotic bone and restore bone continuity with clinical and radiological healing. Depending on the size of the postoperative defect, bone reconstruction can be chosen as a method of restoring the bone contour.

Reconstructive methods involve replacing the excised bone segment with an autologous substitute such as free flaps (fibular, scapular, iliac crest or forearm), or an allogeneic substitute, opting for the material that can best meet the morphofunctional needs of the reconstructive site.

Synthetic inorganic materials such as bioceramics, hydroxyapatite and β tricalcium phosphate, prepared in the form of large volume parts, such as those required for segmental mandibular reconstructions, are susceptible to fracture and contraindicated for this purpose. In contrast, nanoparticle bioglasses are known for their strong osteoregenerative stimulus to the osteoporotic bone, by increasing the alkalinity of the interstitial environment which stimulates angiogenesis, differentiating multipotent cells on the osteoblastic line, and slowing the development of osteoclastic progenitors.

Natural organic materials such as collagen, demineralized bone matrix and fibrin-rich plasma obtain favorable results in combination with other polymers or inorganic constituents that increase the strength of the final product. Rapid resorption reduces the indications of natural polymers to minor defects with the possibility of easy graft immobilization.

Synthetic polymers offer a range of possibilities in both reconstruction and complete regeneration. The polymer network can be arranged architecturally so that it has a strength consistent with that of natural bone by using techniques such as melt molding, electrospinning or 3D printing, or can take the form of a porous osteoconductive scaffold obtained by electrospinning or interfacial adhesion. The strong hydrophobic character as seen in polydioxanone and the lack of osteoinductive potential make it necessary to combine synthetics with inorganic materials or natural polymers in order to obtain a regenerative biomaterial.

The need for biostimulation is required in the case of common defects so that the added material can be transformed into new functional bone that addresses the local requirements. In this sense, bone marrow proteins, growth factors, hormones with bone anabolic effect such as oxytocin are often used.

The body of the patient suffering from osteonecrosis of the maxillary bones on the background of bisphosphonates struggles with external aggressions. For this reason, the ability of constant and continuous release of an antibiotic from the matrix of a strong and durable implant matrix protects the grafted tissues from bacterial invasion, strengthening the chances of integration and proper functioning of the reconstructive piece.

Hypothesis/objectives

The development of BRONJ is the complication of an aggressive treatment applied to a background pathology that affects the body's ability to defend and regenerate. Reconstruction following excision of the necrotic bone encounters major difficulties due to these deficiencies. In this context, the assignment of new constituents to the reconstruction and addition materials to ensure antibacterial protection and biostimulation, exponentially increases the chances of success.

Improvement of a bone implant composed of acrylic resin with Bis-GMA, UDMA and PMMA monomers reinforced with glass fiber, by inserting in its entire composition gentamicin, an antibiotic with superior efficacy on pathogenic bacteria with bone affinity, ensures aseptic conditions during the integration of the implant, and implicitly the success of reconstructive therapy.

To stimulate the cellularity of the grafted tissue, the addition material mimics the bone matrix, in the form of a scaffold with pores dimensions between 50-100 μ m, contains constituents specific to the inorganic substance such as hydroxyapatite, β tricalcium phosphate, and releases chemotactic substances such as heparin, oxytocin which will ensure the transformation of the added material into new bone. With a strong bone anabolic effect, oxytocin promotes the migration and subsequent adhesion of osteoblasts to the added material. In turn, the polymeric matrix degrades at the rate of bone healing, releasing stored oxytocin and heparin as it is absorbed. The use of two polymers, hydrophobic polydioxanone and hydrophilic pluronic, gives the mixture strength, volumetric stability at the time of insertion, biocompatibility, slow resorption by hydrolysis.

Study 1. Observational study of the bisphosphonate related osteonecrosis of the jaw

The first research focuses on the characteristics of BRONJ highlighted by a retrospective study that included 20 patients admitted in the Oral and Maxillofacial Surgery Clinic in Cluj-Napoca.

The inclusion criteria were the pathognomonic signs of BRONJ. The aim of this study was to analyze the statistical, clinical and paraclinical characteristics, as well as the treatment of osteonecrosis of the maxillary bones on the background of bisphosphonate administration. The results obtained were compared with those of similar studies conducted previously.

The only bones of the human skeleton that are relatively related to the outside are the maxillary bones that communicate with the oral cavity through the periodontal space, this condition, increasing the susceptibility to bone infections. The terminal circulation and the antiangiogenic effect of bisphosphonates explain the predisposition of the maxillary bones to osteonecrosis, especially of the mandible. The present study observed a prevalence of mandibular involvement of 55%, similar to that resulting from the study of Filleul (65%) and that found by Beniatti (ratio of mandibular-maxillary involvement 2: 1).

95% of cases of osteonecrosis of the jaws started after tooth extraction, and only one case was due to decubitus injuries caused by the instability of the total prosthesis. The causality is explained by the reduction of the healing capacity of the oral mucosa with the consecutive exposure of the postextractional alveolus.

Most osteonecrotic lesions developed in patients receiving intravenous bisphosphonate, but delayed post-extraction healing without osteonecrosis was observed in patients receiving long-term oral bisphosphonates. Studies focused on the discovery of the determinants of osteonecrosis have shown the synergism between the microenvironment surrounding the healing bone and general factors such as corticosteroid therapy. The concomitant presence of an autoimmune disease significantly increases the chances of developing BRONJ. Also, the combination of antiresorptive therapy with pancreatic diabetes mellitus increases the risk of developing BRONJ.

As an initial treatment, osteonecrotic lesions underwent sequestrectomy (75%), with only 25 percent requiring only washing with antiseptic solutions.

Regarding the antibiotic therapy associated with the surgical treatment, in the present study, amoxicillin with clavulanic acid (40%) prevailed, similar to the therapy applied in Filleul's study, where ampicillin was administered in 39% of cases.

The present study provides a detailed exposition of the most important clinical indicators of the evolution of BRONJ and its surgical treatment, as well as of the therapeutic success corroborated with the evolutionary stage of the pathology.

The limits of this research are imposed precisely by the retrospective way of collecting data, which modifies the clarity of information through the note of subjectivism.

Study 2. Novel antimicrobial biomaterial for craniofacial bone reconstruction

In previous research, polymethyl methacrylate, bisphenol A-glycidyl methacrylate, triethylene glycol dimethacrylate, fiberglass-reinforced E-type composites have been developed and characterized for custom craniofacial implants whose resin surface layer releases gentamicin for a two weeks period. Due to the need to ensure a longer period of antibiotic protection of the reconstructed site, it was proposed and tested in this paper to include gentamicin in the entire mass of the implant.

Ideally, during the polymerization reaction, the entire monomer content binds to the polymer network. The complete polymerization in the case of acrylic resins is relative, a small amount of monomer does not react and remains partially trapped in the polymer matrix.

Efforts to minimize the amount of residual monomer are warranted, given that Bis-GMA and TEGDMA as well as other methacrylic monomers have been shown to be geno and cytotoxic in direct contact with host tissue. There are studies that highlight the allergic effect of methacrylic monomers. Continuous extraction of the residual monomer after fully processed polymerization has been shown to alter the properties of the material, including elasticity, mechanical strength, and service life.

In the present study, three organic solvents (75% ethyl alcohol, acetone and chloroform) were tested for the most effective solution for the complete release of residual monomers after the shortest exposure to the solvent (treatment of less than 8 hours). The results show that Bis-GMA-based resins stored in acetone or chloroform to release the residual monomer have the lowest risk of causing a foreign body reaction due to the release of the remaining monomer.

Following exposure to the solvent, the surface of the samples was examined by scanning electron microscopy (SEM) and alterations of the surface were found with the appearance of cracks and macropores in the case of the use of chloroform as solvent. Instead, treating the samples with acetone or ethyl alcohol preserved the surface texture.

Controlled release of antibiotics is one of the approaches proposed and tested for the development of antibacterial properties of implanted materials. The investigated FRCs have non-degradable crosslinked three-dimensional polymeric matrices, the release of gentamicin being achieved mainly by diffusion. The amount of gentamicin released from the FRC was influenced by the nature and density of the crosslinked network, as well as by the storage time. Heat treatment increases the conversion of double bonds as well as the crosslinking of the polymer and, consequently, a smaller amount of gentamicin can be extracted from the polymer network.

The elution of the antibiotic from the implant is limited in time, however, the integration of gentamicin throughout the mass of the piece, provides antibacterial protection until the time of osseointegration which can extend up to 12 weeks.

Study 3. Preliminary study of in vitro release of oxytocin from the novel alloplastic material polydioxanone-pluronic 127 based

Bone regeneration requires the simultaneous presence of key features that lead to the required bone volume. In this regard, we chose to use two resorbable polymers, biocompatible, to create an osteoconductive network.

Polydioxanone is a versatile polymer that can form the basis of biostructures of different densities and hardnesses, due to its ease of handling.

By interfacial adhesion, the resulting polymeric network has uniformly distributed blank spaces that facilitate the stable binding, throughout the mass of the mesh of the transported biomolecule and the inorganic constituent (hydroxyapatite and tricalcium phosphate). This paper obtains loose mesh whose biodegradable polymer network releases oxytocin stored as it is absorbed by hydrolysis.

The use of oxytocin in the context of bone regeneration has been shown to be useful in animal studies with induced osteoporosis. The development of a local oxytocin release system in the field of bone regeneration has led to the development of polymeric composites in the form of nanoparticles or meshes, which have obtained superior results in terms of bone volume gained, compared to control batches, not loaded with oxytocin. The present study obtained a product in the form of mesh which, in addition to the osteoconductive character provided by the polymer network, stimulates osteoblastic function through oxytocin.

Analyzed by electron microscopy, the appearance of the PDO-PLU-HA matrix surface is a homogeneous mosaic, with a uniform dispersion of the matrix components, respecting the same proportions over the entire surface. The porosity of the polymer matrix, between 20 and 100 μm , facilitates the migration of endothelial cells in the matrix structure and the creation of neofunctional vessels. Evenly dispersed hydroxyapatite crystals promote chemotaxis of osteoforming cells.

High-performance chromatography found a close link between oxytocin and polydioxanone that prevented the release of the hormone in the absence of polymer resorption. In this context, the amount of oxytocin present in the environment in the immediate post-graft period is not sufficient for hormone-specific cellular activation.

To facilitate the release of oxytocin, it has been proposed to integrate heparin as a link between polydioxanone and hormone according to the method of Kim et al.

Study 4. Surface characteristics and cytological biostimulation analysis of the polymeric and composite porous meshes impregnated with oxytocin

The use of heparin as a binder between oxytocin and the polymeric matrix has led to the release of the hormone in optimal parameters for the expected cellular stimulation. Thus, the amount of oxytocin in the environment did not reach the cytotoxic limit and was within the biostimulatory interval throughout the monitoring period for

all 4 samples in the study. The optimal release interval was observed in the polymeric meshes based on polydioxanone, followed closely by the mesh tricalcium phosphate - chitosan.

The porous meshes resulting from the current research have the property of tissue mimicry due to the polymer network similar to the bone matrix and the inorganic content of hydroxyapatite and tricalcium phosphate, substances specific to bone tissue. This aspect has been shown to support cell vitality in the in vitro study of human fibroblasts. Also, the best results were presented by the two meshes that contain polydioxanone.

Subsequent studies will consider the improvement of the mechanical properties of the polydioxanonic mesh, with increasing rigidity thus increasing the range of reconstructible defects.