

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
VICTOR BABEȘ - TIMIȘOARA  
FACULTATEA DE MEDICINĂ DENTARĂ  
DEPARTAMENTUL I

B. LEAN O. OCTAVIA-IULIA



# TEZĂ DE DOCTORAT

TERAPII NECONVENȚIONALE DE REGENERARE A  
ȚESUTULUI GINGIVAL DUPĂ TERAPIE CU BISFOSFONAȚI

Conducător Științific  
Prof. Univ. Dr. ANGELA CODRUȚA PODARIU

Timișoara  
2019

## Cuprins

Lista lucrărilor publicate.....	V
Lista abrevieri.....	VI
Indexul Figurilor.....	VII
Indexul Tabelelor.....	XI
INTRODUCERE.....	XII
PARTEA GENERALĂ.....	1
1. BISFOSFONAȚII.....	1
Structura, mecanismul de acțiune și clasificarea bisfosfonaților.....	1
Mecanismul de acțiune și farmacodinamică.....	4
Farmacocinetică.....	9
Tipuri de bisfosfonați.....	10
Efectele adverse ale bisfosfonaților.....	12
Folosirea bisfosfonaților în oncologie.....	13
Folosirea bisfosfonaților în osteoporoză.....	15
Folosirea bisfosfonaților în boala Paget Osoasă.....	18
Folosirea bisfosfonaților în hematologie.....	18
Etiopatogenie și aspecte clinice ale osteonecrozei maxilarelor secundară tratamentului cu bisfosfonați.....	21
Factorii de risc locali ai osteonecrozei maxilarelor.....	23
Frecvența crescută a osteonecrozei secundară tratamentului cu bifosfonati la nivelul oaselor maxilare.....	26
2 TERAPII ALTERNATIVE ÎN MEDICINA DENTARĂ CU OZON ȘI SALVIA OFFICINALIS.....	27
Ozonul.....	27
Salvia.....	29
PARTEA SPECIFICĂ.....	32
STUDIUL EPIDEMIOLOGIC AL EFECTELOR CITOTOXICE DATE DE UTILIZAREA BISFOSFONAȚILOR ÎN TIMIȘOARA.....	32
SCOPUL STUDIULUI.....	32
MATERIAL SI METODĂ.....	32
REZULTATE.....	34
DISCUȚII.....	46

EVALUAREA INFORMAȚIILOR ȘI CUNOȘȚINȚELOR MEDICILOR DENTIȘTI REFERITOARE LA TERAPIA CU BISFOSFONAȚI .....	49
SCOPUL STUDIULUI.....	49
MATERIAL ȘI METODĂ.....	49
REZULTATE.....	51
DISCUȚII.....	81
POTENȚIALUL BIOLOGIC DE REGENERARE AL OZONULUI ASUPRA FIBROBLASTILOR GINGIVALI STIMULAȚI CU BISFOSFONAȚI.....	85
MATERIAL ȘI METODĂ.....	85
REZULTATE.....	86
DISCUTII:.....	88
CONCLUZII.....	87
TERAPIA NECONVENȚIONALĂ DE REGENERARE A ȚESUTULUI GINGIVAL DUPĂ TERAPIE CU BISFOSFONAȚI FOLOSIND ULEI ESENȚIAL DE SALVIA OFFICINALLIS.....	101
SCOPUL STUDIULUI.....	101
MATERIAL ȘI METODĂ.....	101
REZULTATE.....	102
DISCUȚII.....	106
CONCLUZII.....	108
CONCLUZII.....	109
BIBLIOGRAFIE.....	112
ANEXE .....	120

Cuvinte cheie: bisfosfonați, osteonecroza maxilarelor, ozon, Salvia Officinalis, tesut gingival

Bisfosfonații sunt cei mai utilizați și eficienți agenți anti-resorbtivi, în tratamentul bolilor în care resorbția osoasă este dată de creșterea osteoclastelor, cum ar fi osteoporoza, boala Paget și tumorile care determină osteoliza.

Actualmente, bisfosfonații cu administrare orală sunt larg utilizați în tratamentul osteoporozei. Bisfosfonații cu regim de administrare intravenoasă sunt folosiți în tratamentul bolilor metastatice osoase (consecutive tumorilor maligne de sân, prostată, plămân sau rinichi), a patologiei osteolitice primare (mielom multiplu, boala Paget osoasă) sau pentru ameliorarea efectelor hipercalcemiei din afecțiunile maligne dar și a durerilor asociate din patologia osoasă osteolitică. Comportamentul lor specific constă în activitatea osteoclastică, un timp de înjumătățire mai mare de 10 ani și intervenția în turnover-ul osos.

Bisfosfonații pot avea efecte secundare în zona oro-dentară prin inhibarea mobilității dentare fiziologice, reducerea procesului de vindecare a osului distrus și apariției osteonecrozei maxilare și mandibulare.

Bisfosfonații sunt alcatuiți din două grupuri radicale diferite care determină clasificarea acestora. Primul grup radical este responsabil pentru substanțele chimice propriile și farmacocinetica, al doilea grup radical determină potențialul și mecanismul de acțiune. Există în principal două tipuri de bisfosfonați: non-amino bisfosfonați (non-N-BP) din care fac parte Etidronat și Clodronat, și amino-bisfosfonați (N-BP), cum ar fi Zoledronat, Alendronat, Risedronat, Ibandronat și Pamidronat.

Deși bisfosfonații sunt frecvent administrați în practica clinică, efectele lor secundare sunt numeroase. Din efectele secundare ale bisfosfonaților fac parte iritarea esofagului, disfagie, migrene, obstrucție intestinală, dureri articulare și osoase, dar cel mai important, este osteonecroza maxilarelor. Prescrierea din ce în ce mai des a acestui grup de medicamente a dus la o creștere a incidenței osteonecrozei maxilarelor relaționată cu tratamentele cu bisfosfonați, încercându-se o stadializare a leziunilor din această entitate clinică nouă, precum și schimbarea unor protocoale adecvate de profilaxie și tratament, dar și de a reduce efectele secundare ale acestora.

Cautând metode noi de reducerea a efectelor secundare ale bisfosfonatilor, am identificat în literatura de specialitate, o serie de oportunitati de vindecare si refacere a viabilitatii celulare prin utilizarea Ozonului dar si a uleiului esential de *Salvia Officinalis*. Ozonul (O<sub>3</sub>) este o molecul gazoas natural format din trei atomi de oxigen, foarte reactiva. Puterea benefic a ozonului, fie singur, fie în combinație cu alte medicamente este bine stabilit. Caracteristicile sale cele mai importante sunt:

- a) activitatea sa antimicrobian împotriva bacteriilor aerobe i anaerobe (în special *Staphylococcus aureus*), fungi i viru i;
- b) stimularea sistemului circulator, crescând sinteza hemoglobinei și producția de celule rosii ale sangelui, produc nd astfel oxigenarea tisular ;
- c) ca modulator al celulelor imune, acționând ca o citokin i cre terea fagocitozei i diapedeza acestor
- d) stimuleaza angiogeneza precum i proliferarea fibroblastilor;
- e) capacitatea de reducere a durerii. Ca si efect antimicrobian ozonul provoac inactivarea bacteriilor, a viru ilor, a fungilor. Acesta distruge integritatea membranei celulare bacteriene prin oxidarea fosfolipidelor i a lipoproteinelor.

Utilizarea ozonului în tratamentul osteonecrozei maxilare secundar tratamentului cu bisfosfonati a fost raportat pentru prima dat în literatura de specialitate 2006. Ace ti autori au introdus terapia cu ozon împreuna cu intervenția chirurgicale si antibioterapia, raportând o ameliorare a simptomelor legate de osteonecroza maxilarelor secundar tratamentului cu bisfosfonați în 90% din cazuri. Actiunea ozonului are diferite efecte benefice asupra țesuturilor orale, inclusiv remisia diferitelor modific ri ale mucoaselor, imbunatatirea vindecarii ranilor si cresterea ratei de turnover a celulelor orale.

*Salvia*, cu denumirea stiintific de *Salvia Officinalis* este o plant medicinal folosit ca agent cosmetic, aromatizant. Aceasta prezint proprieti antibacteriene, antifungice, cariostatice, antiplac , antivirale, astringente. În medicina dentar se foloseste în tratamentul bolilor parodontale, în prevenirea apariției halitozei si a leziunilor carioase.

Teza este structurată în patru p rți principale 1. Introducerea, 2. Partea general cu dou capitole, 3. Partea specific cu patru capitole, i 4. Concluzii. În partea general a tezei vor fi descriși bisfosfonații, clasificarea acestora, indicatiile terapeutice, dar si efectele secundare ale acestora mai ales la nivelul oaselor maxilare. Deasemeni în partea generala sunt descrise si substanțele folosite în terapiile neconvenționale, ozonul și salvia, pentru regenerarea țesutului gingival dup terapia cu bisfosfonați, dar i folosirea acestora în medicina dentar .

Obiectivele propuse în cadrul prezentei teze de doctorat vizeaz a) stabilirea particularit ților de ordin epidemiologic și clinic ale osteonecrozei oaselor maxilare secundare tratamentului cu bisfosfonați la nivelul populației din Timișoara, b) evaluarea

modului în care se realizează anamneza în cabinetele de medicină dentară din vestul țării, interdisciplinaritatea acestora cu medicii de familie dar nu în ultimul rând de a evalua nivelul de cunoștințe a acestora față de abordarea pacienților sub tratament cu bisfosfonați, c) testarea citotoxicității atât a bisfosfonaților administrați per os cât și a celor administrați intravenos asupra fibroblastelor gingivale umane și de a încerca contracararea acestor efecte nocive prin acțiunea benefică a ozonului d) utilizarea uleiului esențial de *Salvia Officinalis* ca o terapie neconvențională de regenerare a țesutului gingival după terapia cu bisfosfonați, aplicând uleiul pe fibroblaști gingivali umani stimulați anterior cu bisfosfonați.

Partea specifică este împărțită în patru capitole

1. Studiul epidemiologic al efectelor citotoxice date de utilizarea bisfosfonaților în Timișoara
2. Studiu epidemiologic privind informațiile și cunoștințele medicilor dentiști în terapia cu bisfosfonați
3. Potențialul biologic de regenerare al ozonului asupra fibroblastilor gingivali stimulați cu bisfosfonați
4. Terapie neconvențională de regenerare a țesutului gingival după terapie cu bisfosfonați folosind ulei esențial de *Salvia Officinalis*

În primul capitol al părții specifice intitulat Studiul epidemiologic al efectelor citotoxice date de utilizarea bisfosfonaților în Timișoara s-a încercat stabilirea particularităților de ordin epidemiologic și clinic ale osteonecrozei oaselor maxilare secundare tratamentului cu bisfosfonați în populația zonei Timișoara. Astfel s-a realizat un studiu de tip retrospectiv desfășurat pe un lot de 122 de pacienți internați cu diagnosticul de osteonecroza maxilarelor secundar tratamentului cu bisfosfonați în Clinica de Chirurgie Orală și Maxilo-Facială din cadrul Spitalului Municipal din Timișoara, în perioada 2010-2018. Cazuistica provine din analiza foilor de observație ale pacienților la care au fost cercetate următoarele aspecte: epidemiologice (repartiția cazurilor pe anii de studiu, pe grupe de vârstă, sex) și clinice (prezența neoplaziilor, metastazelor osoase sau a altor patologii). Analiza statistică a datelor obținute a evidențiat incidența cea mai crescută a cazurilor în anul 2017, localizarea osteonecrozei preponderent la nivelul mandibulei. Cele mai multe cazuri de osteonecroza secundară tratamentului cu bisfosfonați s-au întâlnit la pacienții cu diagnosticul de neoplasm mamar, urmat de neoplasm de prostată și osteoporoza, astfel epidemiologia osteonecrozei maxilarelor secundară tratamentului cu bisfosfonați este legată de epidemiologia afecțiunilor de bază. Majoritatea pacienților au făcut parte din grupa de vârstă 60-69 de ani, iar repartiția pe sexe a fost aproximativ egală.

În cel de-al doilea capitol al părții specifice intitulat Studiu epidemiologic privind informațiile și cunoștințele medicilor dentiști în terapia cu bisfosfonați s-a încercat evaluarea modului în care se realizează anamneza în cabinetele de medicină dentară din vestul țării, și nivelul de cunoștințe a medicilor stomatologi față de abordarea pacienților sub tratament cu bisfosfonați. Astfel s-a aplicat un chestionar medicilor dentiști participanți la o conferință din partea de Vest a României. Chestionarul cuprinde 21 de întrebări și a fost structurat în două mari părți: prima parte s-a adresat modului în care medicul dentist realizează anamneza și legătura pe care o are acesta cu medicul de familie iar în a doua parte se chestionează nivelul de cunoaștere și modul de acțiune a stomatologilor față de pacienții sub terapie bisfosfonați. După interpretarea rezultatelor obținute putem spune că unul dintre cele mai importante roluri în abordarea unui pacient care se prezintă la stomatolog este realizarea unei anamneze detaliate și corecte, pentru a strânge toate informațiile referitoare la istoricul medical al pacientului înainte de începerea tratamentului cu bisfosfonați. În plus, anamneza trebuie efectuată pe întreaga perioadă de tratament. În acest studiu, majoritatea medicilor stomatologi trebuie să recunoască indicațiile medicale ale bisfosfonatilor, dar în ciuda faptului că literatura de specialitate este abundentă în informații cu privire la bisfosfonați și efectele lor adverse, există medici stomatologi care nu cunosc efectele acestor medicamente.

În cel de-al treilea capitol al părții specifice intitulat Potențialul biologic de regenerare al ozonului asupra fibroblastelor gingivale stimulați cu bisfosfonați s-a testat citotoxicitatea atât a bisfosfonaților administrați per os cât și a celor administrați intravenos asupra fibroblastelor gingivale umane și s-a încercat contracararea acestor efecte nocive prin acțiunea benefică a ozonului.

Bisfosfonații sunt compuși cu activitate importantă asupra recuperării osoase datorită implicării în metabolismul osos și al bolilor osoase implicite. Principalul efect secundar al administrării lor îl reprezintă osteonecroza maxilarelor din sfera oro-dentară. Pentru realizarea acestui studiu s-au utilizat 4 produse comerciale, foarte des utilizate în terapia specifică, din două clase diferite de bisfosfonati (administrare orală și injectabilă) nu doar substanțele active, pentru a urmări efectul citotoxic al acestora asupra fibroblastelor gingivale, pentru ca apoi să observăm efectul protector de proliferare și regenerare al ozonului asupra fibroblastelor gingivale. Pentru a verifica toxicitatea potențială a Bisfosfonatilor fost aplicat testul Alamar blue. Pe scurt, celulele fibroblaste gingivale au fost însemănțate în plăci cu 96 de godeuri ( $1 \times 10^4$  celule / godeu / 200  $\mu$ L) și lăstate să crească până se ajunge la confluența adecvată (24-48 ore). S-au adăugat în mediu proaspăt de cultură concentrații diferite (1,5; 2,5; 5 și 10  $\mu$ M) din compușii testați (Actonel-A; Fosamax-F; Ossica-O; acidul Zolendronic-Z). După 24 de ore, s-au adăugat 20  $\mu$ L de albastru Alamar, s-au incubat timp de 3 ore la 37 °C și s-au măsurat valorile de absorbție la 570 și 600 nm cu ajutorul spectrometrului microplacii.

xMark™ (Biorad). Pentru a determina efectul ozonului (soluție salin salin O<sub>3</sub> - 80 μg / ml) asupra viabilității celulelor și impactul acesteia asupra capacității celulelor de recuperare după toxicitatea compușilor de test, celulele fibroblaste gingivale au fost stimulate cu Actonel și Fosamax (compuși care s-au dovedit a fi citotoxici, 2,5, 5 și 10 μM) timp de 24 de ore. Mediul vechi a fost îndepărtat și s-au adăugat 100 μL de mediu proaspăt și 100 μL de soluție salină de ozon / godeu timp de 24 de ore. Putem spune că nu toți bifosfonatii (Acidul Zolendronic, Ossica, Fosamax, Actonel) au efect citotoxic asupra fibroblastelor gingivale primare, doar cei cu administrare orală (Actonel și fosamax), dar stimularea cu soluție de ozonată a fibroblastilor distrusi, a condus la o creștere semnificativă a procentului de celule viabile și a îmbunătățit capacitatea celulelor de a se recupera prin stimularea creșterii și proliferării lor. Putem spune că ozonul are un efect protector prin regenerarea fibroblastilor gingivali degenerați de expunerea la bifosfonatii din Fosamax și Actonel.

În ultimul capitol din partea specific intitulat Terapie neconvențional de regenerare a țesutului gingival după terapie cu bisfosfonați folosind ulei esențial de Salvia Officinalis s-a aplicat in vitro uleiul esențial pe fibroblaști gingivali umani stimulați anterior cu bisfosfonați pentru a demonstra eficacitatea acestuia de regenerare a celulelor.

Celulele fibroblaste gingivale au fost însemănțate în plăci cu 96 de godeuri (1x10<sup>4</sup> celule / godeu / 200 μL) și lăstate să crească până se ajunge la confluența adecvată (24-48 ore). S-au adăugat în mediu proaspăt de cultură concentrații diferite (2,5; 5 și 10 μM) din compușii testați (Actonel; Fosamax;). Efectele soluției de compuși de testat asupra morfologiei celulelor au fost evaluate prin captarea de imagini înainte de adăugarea compușilor de testat și după perioada de stimulare (24, respectiv 48 de ore). Imaginile au fost obținute prin utilizarea microscopului inversat Olympus IX73 cu o cameră foto DP74 și având software-ul CellSens V1.15 (Olympus, Tokyo, Japonia). Pentru a determina efectul uleiului esențial de Salvia Officinalis asupra viabilității celulelor și impactul acestuia asupra capacității celulelor de recuperare după toxicitatea compușilor de test, celulele fibroblaste gingivale au fost stimulate inițial cu Actonel și Fosamax timp de 24 de ore. Mediul vechi a fost îndepărtat și s-au adăugat 100 μL de mediu proaspăt și 20 μL de ulei esențial de Salvia Officinalis/ godeu timp de 24 de ore. Post-stimulare cu bisfosfonați apare o degradare morfologică a celulelor stimulate doar Actonel sau Fosamax în diferite concentrații, în schimb fibroblastii gingivali stimulați inițial cu bisfosfonați apoi adăugat ulei esențial de Salvia Officinalis prezintă o morfologie celulară aproape similară cu cea normală, ceea ce indică faptul că uleiul esențial de salvie a avut un efect protector împotriva toxicității bisfosfonaților.

Concluziile generale ale tezei de doctorat, descrise pe larg în ultimul capitol au fost

- Incidența cazurilor de osteonecroză maxilarelor secundar tratamentului cu bifosfonați este în creștere, fapt ce duce la încercarea de a preveni și de a găsi noi metode de tratament a acestei afecțiuni



- Anamneza corect realizat și informarea medicilor denti ti referitor la efectele bisfosfonaților la nivelul oaselor maxilare este un factor important in prevenirea apariției osteonecrozei.
- Ozonul și uleiului esențial de *Salvia Officinalis*, in vitro, prezint efecte benefice precum si capacitatea de a reduce citotoxicitatea fibrobla tilor gingivali umani stimulați anterior cu bisfosfonați