



UNIVERSITATEA
DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
VICTOR BABEȘ | TIMIȘOARA

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„VICTOR BABEȘ” DIN
TIMIȘOARA
FACULTATEA DE MEDICINĂ
DENTARĂ
Departamentul I**

BOLDEANU LUCIA-CAMELIA



**CONTRIBUȚII LA STUDIUL HISTOLOGIC AL
PREPARATELOR NE-DEMINERALIZATE
COMPLEXE OS-METAL-ȚESUTURI MOI DIN
IMPLANTOLOGIA ORALĂ
REZUMAT**

Conducător științific

PROF. UNIV. DR. DR. STRATUL ȘTEFAN-IOAN

Timișoara

2023

Consiliul pentru Studii Universitare de Doctorat

P-ța Eftimie Murgu nr. 2, Timișoara,
cod 300041, România
Tel: (40)256204250,int 1422
Email: doctorat@umft.ro

www.umft.ro

Cuprinsul tezei:

Lista cu lucrările științifice publicate

Lista cu abrevieri și simboluri

Lista cu figuri

Lista cu tabele

Dedicație

Mulțumiri

INTRODUCERE

PARTEA GENERALĂ

1. Tehnici de preparare histologică a țesuturilor osoase ne-demineralizate

1.1. Introducere

1.1.1. Istoric

1.1.2. Histologia secțiunilor ne-demineralizate - metoda de elecție în patologia peri-implantară

1.2. Principalele protocoale histologice utilizate în analiza țesuturilor osoase ne-demineralizate

1.2.1. Protocolul clasic Donath – Breuner

1.2.2. Contribuții și modificări aduse de alți autori la protocolul original Donath – Breuner

1.3. Prepararea specimenelor ne-demineralizate în histologia țesuturilor dure

1.3.1. Fixarea și deshidratarea

1.3.2. Materiale pentru înglobarea preparatelor complexe os – metal – țesuturi moi

1.3.3. Sisteme de obținere a secțiunilor de preparate osoase ne-demineralizate

1.3.3.1. Sistemul Exakt

1.3.3.2. Sistemul Leica

1.3.3.3. Sistemul Precise 1

1.3.3.4. Sisteme moderne bazate pe laser

1.3.4. Colorații uzuale și speciale pentru preparatele osoase ne-demineralizate

2. Metode microscopice de analiză a secțiunilor preparatelor complexe ne-demineralizate os-metal-țesuturi moi

2.1. Analiza la microscopul cu câmp luminos (LM)

2.2. Microscopia confocală cu scanare laser (CLSM)

2.3. Analiza la microscopul fluorocrom

2.4. Analiza microimagică și macroimagică a preparatelor complexe ne-demineralizate os-metal-țesuturi moi

2.4.1. Microradiografia, micro-CT

2.4.2. CBCT

3. Modele experimentale animale în histologia preparatelor complexe os-metal-țesuturi moi din implantologia orală și limitele acestora

3.1. Modelul canin

3.2. Alte modele animale

4. Aspecte particulare ale inițierii și progresiei bolii peri-implantare umane reflectate în histologia preparatelor complexe os-metal-țesuturi moi din implantologia orală

5. Descriptori histologici și parametri histomorfometrici utilizați pentru evaluarea secțiunilor ne-demineralizate os-implant-țesuturi moi

PARTEA SPECIALĂ

6. Evaluarea histomorfometrică și CBCT a progresiei pierderii de țesut indusă de ligaturi aplicate consecutiv și alternativ în peri-implantita experimentală pe un model canin: un studiu-pilot

6.1. Introducere

6.3. Materiale și metode

6.4 Rezultate

6.5. Discuții

6.6. Concluzii

7. Influența grosimii secțiunii eșantionului asupra acurateței și specificității parametrilor histometrici în microscopia confocală cu scanare laser pe un model canin de peri-implantită experimentală. O analiză „proof of concept”

7.1. Introducere

7.2. Materiale și metode

7.3. Rezultate

7.4. Discuții

7.5. Concluzii

8. Evaluarea în microscopia cu fluorescență intravitală utilizând trei filtre a arhitecturii tisulare în peri-implantita indusă experimental pe un model canin

8.1. Introducere

8.2. Materiale și metode

8.4. Rezultate

8.5. Discuții

8.6. Concluzii

9. Concluzii generale și contribuții personale

BIBLIOGRAFIE

ANEXE

Introducere:

Osul este considerat cel mai important țesut de suport din tot organismul. Este compus din celule, matrice organică extracelulară și săruri anorganice. Țesutul osos este mineralizat în straturi care furnizează acestuia o rezistență crescută și o flexibilitate înaltă. Acesta variază ca formă, deoarece depinde de funcția îndeplinită în organismul din care face parte. Aceste diferențe funcționale și de formă se bazează, de asemenea, pe procesele organice sau anorganice încorporate sau produse în formarea unui anumit țesut osos. Cel mai răspândit mineral din structura osoasă este hidroxiapatita care este alcătuită din collagen, proteine și ioni carbonați. Osul se constituie din aproximativ 70% minerale și 30% componente organice, în funcție de greutate. Celulele osoase, spre deosebire de celulele medulare, sunt mai rare.

Fiziologia osoasă a fost mai bine înțeleasă în anii 1950 odată cu dezvoltarea tehnicilor de ambalare plastică pentru examinarea microscopică a secțiunilor ne-demineralizate de țesut osos. În trecut, în vederea examinării, histologia osoasă necesita îndepărtarea celei mai importante componente, mineralul. Noile tehnologii au fost îmbunătățite considerabil de atunci.

Tratamentul cu implanturi dentare a devenit în ultimii ani de elecție pentru pacienții edentați, raportându-se rate de succes de peste 95,4% după 5 ani de funcție. Deși aceste valori sunt extraordinare, inflamația peri-implantară este frecvent întâlnită și poate determina resorbție osoasă în jurul implanturilor și chiar pierderea acestora. Osul peri-implantar este observat des, prin metode imagistice, în fazele inițiale după inserarea implanturilor și/sau după încărcare. Aceste pierderi sunt atribuite de obicei răspunsului de vindecare osoasă, denumită remodelare fiziologică. Consecutiv acestei remodelări naturale, osul marginal se poate resorbi datorită inflamației peri-implantare indusă de placa bacteriană și poate progresa spre pierderea osteointegrării, ce poate influența în mod negativ succesul pe timp îndelungat al tratamentului cu implanturi dentare. Boala peri-implantară a fost definită în 2018 de Academia Americană de Parodontologie și de Federația Europeană de Parodontologie, în cadrul Clasificării Bolilor și Condițiilor Parodontale și Peri-implantare, ca fiind o afecțiune asociată plăcii microbiene. Aceasta debutează în țesuturile moi din jurul implanturilor dentare, definită drept mucozită peri-implantară, progresând spre țesuturile dure de suport, moment în care se instalează peri-implantita.

Partea generală înfățișează stadiul actual al cunoașterii în domeniu, tehnologii și protocoale histologice de preparare ale secțiunilor ne-demineralizate complexe.

Tehnica histologică de obținere a secțiunilor de țesuturi ne-demineralizate complexe, urmărește, în principal, să reveleze procesele de regenerare osoasă sau apozitie osoasă care se petrec în proximitatea implanturilor dentare inserate. Aceste tehnici sunt de obicei laborioase și sunt indicate în investigația biologiei țesutului osos. Utilizarea țesuturilor ne-decalcificate permite diferențierea osului matur de cel

imatur și cuantificarea unor variabile precum sunt interfața os-implant, densitatea ariei osoase și viteza de apozitie osoasă. Debutul procesării specimenelor de țesuturi dure și moi ce conțin aliaje metalice pentru analiza metalografică, respectiv tehnica de secționare-finisare a mostrelor histologice, a fost mai întâi descrisă de Donath și Breuner în anul 1982.

Au fost propuse mai multe metode de inducere a peri-implantitei la modele experimentale, subiecții umani fiind supuși reglementărilor de natură etică și morală. Este foarte bine documentat faptul că specia canină prezintă o susceptibilitate naturală la boala parodontală, fiind așadar cel mai utilizat model experimental. Relația cauză-efect dintre colonizarea plăcii microbiene și patogenia bolii peri-implantare a fost inițial investigată în studii preclinice pe animale prin mijloace de degradare a suportului dur și moale al implanturilor dentare. La aceste modele a fost indusă apariția leziunilor peri-implantare prin aplicarea submarginală a ligaturilor din bumbac. Până în prezent, acest model experimental de inducere a defectului peri-implantar este standardul de aur, pentru a investiga patogenia și terapia bolii peri-implantare. Odată cu creșterea numărului investigațiilor pe aceste modele animale, a apărut necesitatea reglementărilor de ordin etic, în speță ghidul ARRIVE, care recomandă utilizarea a cât mai puține modele animale (dacă finalul experimentului o reprezintă *exitus*) și utilizarea acestora ca propriile lor controale (“within-subject experiments”).

Deși foarte multe tehnici sofisticate și costisitoare au apărut odată cu dezvoltarea tehnologiei din ultimii ani, microscopia în câmp luminos a rămas “standardul de aur”, deoarece s-a dovedit a fi o metodă de investigație extrem de valoroasă, ce permite furnizarea unor informații importante cu privire la procesele de remodelare osoasă asupra specimenelor ne-demineralizate de țesut dur oral. Cu toate acestea, evaluarea histologică a specimenelor osoase, în special a celor hibride, ce conțin biomateriale sintetice, reprezintă o provocare din punct de vedere tehnic.

Partea specială include trei studii experimentale, menite să introducă un model canin de inducere a bolii peri-implantare și o simplificare a protocolului clasic de procesare al specimenelor ne-demineralizate complexe țesuturi moi – țesuturi dure – implant dentar.

Astfel, desfășurarea cercetărilor personale a inclus un studiu-pilot în cadrul căruia a fost analizată histologic și radiologic degradarea țesuturilor moi și dure, din jurul implanturilor la care au fost aplicate ligaturi consecutive și alternative, la aceeași hemimandibulă pe un model canin. A mai fost investigată și influența implanturilor ligaturate asupra celor neligaturate. La analizarea parametrilor histomorfometrici și pe CBCT, au rezultat punji peri-implantare adânci pe aspectul oral și resorbție osoasă pronunțată pe aspectul vestibular al implanturilor ligaturate analizate și o afectare mai puțin pronunțată a implanturilor neligaturate, în pofida proximității acestora față de cele ligaturate. Analiza histologică pe secțiuni subțiri ne-demineralizate la microscopul în câmp luminos, a confirmat inflamația intensă a țesutului moale, o pronunțată resorbție osoasă și o cantitate mai mare de țesut conjunctiv infiltrat la implanturile ligaturate, față de cele neligaturate. În concluzia studiului, s-a notat evaluarea cu succes a modelului experimental neligaturat de inducere a peri-implantitei, satisfăcând în același timp

și cerințele designurilor ce utilizează un număr redus de animale experimentale.

Pentru analizarea secțiunilor ne-demineralizate de grosimi mai mari, microscopul confocal cu scanare laser poate fi utilizat deoarece penetrează țesuturile până la o profunzime de 300-500 micrometri și reflectă imagini care nu sunt doar la suprafața specimenului. Imaginile 2D obținute pot sta la baza reconstrucțiilor tridimensionale, unde se pot observa matricea osoasă nedemineralizată, interfața os-implant și osul mineralizat.

A doua parte a cercetărilor personale a inclus un studiu de tip „proof of concept” pentru evaluarea degradării tisulare la microscopul confocal cu scanare laser, utilizând autofluorescența țesuturilor din jurul implanturilor ligaturate și neligaturate. A fost analizată și influența grosimii secțiunilor asupra acurateții observațiilor histologice, în comparație cu cele „subțiri” utilizate la microscopul în câmp luminos. Rezultatele studiului au inclus valori mai mari ale resorbției tisulare la analiza histologică a secțiunilor „groase” (250-300 micrometri) față de cele „subțiri” (30 micrometri). În concluzia studiului a fost notată contribuția semnificativă a analizei la microscopul confocal cu scanare laser a lamelor „groase” prin reconstrucțiile tridimensionale obținute, a căror preparare este mai facilă față de cele clasice „subțiri”. De asemenea, deși acest tip de investigație poate necesita o tehnologie mai avansată, cantitatea și calitatea datelor obținute, pot justifica această abordare.

Pentru suplimentarea setului de date, cu privire la procesele care se petrec în cadrul degradării tisulare din peri-implantita experimentală, substanțe fluorocromice pot fi administrate intravital. Secțiunile preparate pentru analiza markerilor fluorocromici sunt de obicei subțiri, pentru a evidenția markerii, nu necesită colorare suplimentară, ca în cazul microscopiei în câmp luminos, iar secțiunile uscate sunt analizate cu ajutorul unui echipament microscopic fluorescent, la care sunt adăugate diferite filtre de tipul celor UV, verde, albastru sau roșu. Această metodă este simplă, stabilă și se bazează pe detectarea osului nou format sau resorbit și poate fi utilizată ca un marcaj al momentului la care aceste procese osoase se petrec.

A treia parte a cercetărilor personale, include investigarea degradării tisulare obținute prin plasarea de ligaturi în jurul implanturilor la un model canin, utilizând două marcaje fluorocromice intravitale, sub trei filtre la microscopul cu fluorescență, ca o alternativă la evaluarea sub microscopul în câmp luminos. Rezultatele studiului au confirmat activitatea de remodelare osoasă din jurul implanturilor, în timpul perioadei de vindecare, la observarea sub microscopul cu fluorescență și inflamația tisulară intensă, observată sub microscopul în câmp luminos. Concluziile studiului au inclus utilitatea complementară a fluorescenței față de „standardul de aur” reprezentat de investigațiile la microscopul în câmp luminos, oferind informații suficiente și solide cu privire la procesele de apozitie osoasă.

Până în prezent, nu există în literatura de specialitate un consens cu privire la exactitatea metodei de inducere experimentală a peri-implantitei la modele animale. De asemenea, nu s-a observat un consens în alegerea grosimii secțiunilor de specimene ne-demineralizate de țesut moale – țesut osos – implant dentar, ceea ce face dificilă alegerea unei tehnici care să ofere simultan relevanță histologică,

cu costuri scăzute și cu un timp de procesare minim.

Concluzii:

1. În prezent, lipsa unui consens legat de exactitatea modului de inducere a peri-implantitei experimentale la modelul canin, cât și de incertitudinea influenței pe care o au ligaturile asupra țesuturilor moi și dure din jurul implantelor, fac ca cercetarea acestei direcții să fie de maximă importanță în literatura de specialitate peri-implantară.

2. Din cercetarea literaturii de specialitate reiese că unii autori consideră ligaturile ca factor de inducere a apariției peri-implantitei, în timp ce alți autori afirmă că ligaturile acționează ca un corp străin, la care organismul reacționează în mod natural. Acesta este un aspect insuficient dovedit și sunt necesare studii suplimentare în această direcție.

3. În prezent, după decenii de cercetare, studiul terapiilor peri-implantare se bazează pe modele de inducere a peri-implantitei experimentale la modele animale care nu sunt complet în acord cu fiziopatogenia peri-implantitei umane.

4. Cercetarea de față a propus introducerea modelului experimental neligaturat de apariție în mod spontan a inflamației peri-implantare, îndeplinind în același timp și cerințele pentru designul studiilor experimentale cu un număr redus de modele animale utilizate.

5. Influența implanturilor afectate de peri-implantită severă asupra implanturilor învecinate a fost evaluată și a evidențiat existența pierderii de țesut.

6. Aceste rezultate pot influența alegerea abordării terapeutice în momentul confruntării cu diferite grade de severitate a bolii la implanturile învecinate.

7. În prezent, nu există un consens în literatura de specialitate cu privire la grosimea secțiunilor analizate, care pare a fi dictată mai mult de preferințele personale ale autorilor, bazate pe anumite scopuri ale cercetării și mai puțin pe o corelare clară între grosimea secțiunilor și rezultatele histologice urmărite.

8. În acest sens, cercetarea de față propune o simplificare a protocolului tradițional histologic, prin utilizarea secțiunilor „groase” (250-300 micrometri), de țesuturi ne-demineralizate complexe de peri-implantită indusă experimental la un model canin, care, înglobate și manipulate corespunzător, pot asigura obținerea facilă de informații relevante, examinate sub CLSM.

9. Informațiile obținute astfel pot fi lipsite de precizia celor obținute prin vizualizarea secțiunilor „subțiri” sub LM, dar pot oferi date complementare, precum reconstrucțiile 3D. Deși investigarea acestor specimene la CLSM poate părea complicată și solicitantă din punct de vedere tehnologic, informațiile obținute sunt numeroase și pot justifica această abordare.

10. În prezent, este cunoscut faptul că secțiunile de preparate ne-demineralizate complexe de peri-implantită indusă experimental la un model canin furnizează informații într-un mod rapid și facil cu privire la mecanismul resorbției osoase.

11. În cercetarea de față, s-au comparat cu succes secțiunile „subțiri” sub un microscop cu

fluorescență, cu aceleași secțiuni vizualizate sub microscopul în câmp luminos, pentru a furniza informații referitoare la procesele de apozitie osoasă.

12. Furnizând informații suficiente și relevante, microscopia cu fluorescență a demonstrat că reprezintă o abordare complementară, care permite evaluarea activității osoase din jurul implanturilor dentare din momentul inserării până în momentul integrării complete, iar ulterior, până la resorbția completă din timpul progresiei bolii peri-implantare.

13. Deși în cercetările din teza de față s-a observat că simplificarea protocoalelor histologice este posibilă prin utilizarea tehnologiilor moderne, limitările studiilor îndeamnă la derularea de noi cercetări în domeniu; studiile viitoare se vor concentra pe rafinarea metodelor de inducere a peri-implantitei experimentale, pe simplificarea protocoalelor histologice și pe manipularea fără riscuri a specimenelor complexe de țesut osos – țesut moale – implant dentar.