

RAPORT SINTETIC

Cod proiect **PN-III-P1-1.2-PCCDI-2017-0239** cu titlul „**Obținerea și expertizarea unor noi materiale biocompatibile pentru aplicații medicale**” acronym **MedicalMetMat**, Nr. contract **60 PCCDI/2018**

Director Proiect Prof. univ dr Corneliu Munteanu, Universitatea Tehnică Gheorghe Asachi, Iași

Responsabil Partener 3 **UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRICOLE ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ (UNIVERSITATEA PENTRU ȘTIINȚELE VIEȚII) „ION IONESCU DE LA BRAD” DIN IAȘI**

Prof. univ dr Gheorghe Solcan

Perioada de implementare: 1.03.2018-30.06.2021

Suma alocată pentru partener 3 USAMV (USV) 544755 lei

USAMV (USV) a fost parteneră în 4 din cele 5 proiecte componente

1. Aliaje biodegradabile pe bază de Mg pentru implanturi ortopedice (Acronim - ORTOMAG), responsabil Șef lucr. Dr. Eusebiu Viorel Șindilar

2. “Aliaje biocompatibile pe bază de titan pentru protetica medicala din sisteme complexe microaliate – BioTIT” Responsabil Proiect, Șef lucr. dr. Mihaela-Claudia SPATARU

3. Dezvoltarea unor noi aliaje dentare cu ruteniu, (Acronim BIODENTRUT), Responsabil Șef lucr. Dr. BURTAN Liviu

4. ALIAJE BIOCOMPATIBILE CU ENTROPIE RIDICATA PENTRU APLICAȚII MEDICALE, acronim **HEAMED** Responsabil Conf.dr.GetaPavel

Știința biomaterialelor este „știința care se ocupă cu interacțiunile dintre organismele vii și materiale”, iar **biomaterialele** ca fiind „orice substanță sau combinație de substanță, de originenaturală sau sintetică, care poate fi folosită pe o perioadă de timp bine determinată, ca un întreg sauca o parte componentă a unui sistem care tratează, grăbește, sau înlocuiește un țesut, organ sau ofuncție a organismului uman”(Williams 1992). Astfel s-a născut știința biomaterialelor cu un vocabular medical și științific îmbogățit de noitermeni, destinați definirii interacțiunii între un organism viu si un material.

Ortopedia, chirurgia estetica, oftamologia, chirurgia maxio-facială, cardiologia, urologia, neurologia și practic toate specialitățile medicale nu numără mai puțin de 400 de produse diferite și 10% din activitățile medicale necesită utilizarea de biomateriale în scopuri de: diagnostic, prevenție și terapie (figura 1). Din categoria biomaterialelor folosite pentru realizarea implanturilor și a dispozitivelor medicale fac parte următoarele materiale: polimerii, metalele, ceramicele și compozitele. O gamă largă de polimeri se folosesc în aplicațiile medicale, aceasta datorându-se faptului că aceștia segăsesc sub diferite forme complexe și compoziții (solide, fibre, fabricate, filme și geluri). Totuși în cazul implanturilor folosite la protezarea articulațiilor aceste materiale se folosesc mai puțin datorită faptului că nu îndeplinesc în totalitatea proprietățile mecanice ce se necesită în astfel de cazuri.

Metalele sunt unele dintre cele mai folosite biomateriale în cazul implanturilor ortopedice, șinu numai. Acestea sunt cunoscute pentru rezistența mare la uzură, ductibilitate și duritate ridicată. Cel mai des folosite metale pentru realizarea implanturilor sunt oțelurile inoxidabile, aliajele de cobalt-crom-molibden, titanul și aliajele de titan. Titanul și aliajele acestuia sunt folosite cu precădere la realizarea implanturilor ortopedice datorită faptului că proprietățile mecanice aleacestuia sunt asemănătoare cu cele ale țesutului osos. Principalele dezavantaje al acestor metale sunt rigiditatea ridicată pe care o au în comparație cuțesuturile gazdă, precum și tendința acestora de a crea artefacte în cazul procedeeleor dedagnosticare avansate (investigarea cu computerul tomografic și rezonanță magnetică). De asemenea, oțelurile inoxidabile și aliajele de cobalt cu crom sunt predispuse la coroziune,eliberând în organism ioni metalici ce pot cauza reacții alergice (Speide și Uggowitzer, 1998).

Ceramicele sunt, de asemenea, foarte des întâlnite în aplicațiile medicale datorită unei biocompatibilități bune cu țesutul gazdă, o rezistență ridicată la compresiune și coroziune.

2. CLASIFICAREA BIOMATERIALELOR

Există trei tipuri de biomateriale ce se disting după **interacțiunea lor cu mediul biologic**:

- materiale bioinerte,
- materialele bioabsorbante,
- materiale bioactive.

Materialele bioinerte cum ar fi titanul, tantalul, polietilena și alumina, expun o foarte mică interacțiune chimică cu țesuturile adiacente. Țesuturile pot adera la suprafața acestor materiale inerte fie prin creșterea acestora în microneregularitățile suprafeței (osteointegrare) fie prin folosirea de adeziv special (acrilat). Pe termen lung, acesta din urmă nu este modul ideal de fixare aimplanturilor, de regulă cele ortopedice și stomatologice. Cu toate acestea, multe din implanturi polimerice sunt considerate a fi sigure și eficace pe o perioadă cuprinsă între câteva luni și câțiva ani. Reacția biologică este inevitabilă, dar este compensată de modul de proiectare a implanturilor.

Materialele bioabsorbante cum ar fi fosfatul tricalcic, acidul copolimeric polilactic-poliglicolic, chiar și unele metale, sunt astfel concepute încât acestea să poată fi ușor absorbite de organism ș înlocuite de țesuturile adiacente (țesutul osos sau pielea). Acest tip de materiale sunt folosite în cazul transportului de medicamente sau în cazul structurilor implantabile biodegradabile cum ar fiața chirurgicală.

Din categoria **materialele bioactive** fac parte materialele sticloase, ceramicele, combinațiile alematerialelor sticloase cu ceramicele și hidroxiapatita care conține oxizi de silicon (SiO_2), sodiu(NaO_2), calciu (CaO), fosfor (P_2O_5) și alți constituenți de materiale care ajută la formarea de

legături chimice cu țesutul osos. Aceste materiale sunt bioactive datorită legăturilor pe care acestea le realizează în timp cu țesutul osos și în unele cazuri cu țesutul moale. În particular, are loc o reacție de schimb de ioni între materialul bioactiv și lichidele corpului, prin care particule de material difuzează în lichid și viceversa, rezultând în timp, un strat biologic activ de fosfat de calciu, care este chimic și cristalografic echivalent cu structura osoasă. De asemenea, materialele bioactive par să fie răspunsul ideal în cazul fixării oaselor în urma fracturilor, dar nu sunt potrivite în cazul implanturilor de articulații, acolo unde gradul de frecare dintre materialele în contact este foarte mare.

În funcție de **natura biomaterialelor** întâlnim:

- biomateriale naturale (materiale biologice): -organice, -anorganice;
- biomateriale sintetice: -metalele, -polimerii, -ceramicele, -compozitele. În ultima decadă se pune tot mai mult accent pe înlocuirea materialelor sintetice utilizate în medicina umană și veterinară cu materiale biosintetice (bioartificiale). Aceste materiale conțin cel puțin o componentă naturală care are scopul de a mări gradul de biocompatibilitate al materialului respectiv și de a grăbi procesul de vindecare. Componenta naturală a materialelor bioartificiale poate fi o proteină (colagen, fibronectina, elastina), un polizaharid din clasa glicozaminoglicanilor (condroitin sulfat, heparină, heparan sulfat, acid hialuronic), o secvență peptidică cu rol în recunoașterea celulară sau în procesul de adeziune. Aceste componente sunt cel mai adesea macromolecule ale matricei extracelulare ale țesuturilor cu care materialele intră în contact și care sunt implicate în procesele de vindecare.

Biomateriale metalice

Proprietățile materialelor sunt guvernate direct chiar de structura lor. La nivel atomic, metalele sunt formate din ioni pozitivi, aflați în interiorul norului de electroni liberi. Acest nivel atomic este responsabil pentru caracteristicile și proprietățile distincte ale metalelor. Legăturile metalice permit atomilor să se autoaranjeze într-o anumită ordine, să se repete și să se organizeze într-un model cristalin tridimensional. Electronii liberi sunt responsabili pentru proprietățile electrice și de conductibilitate termică a metalelor. Datorită faptului că legăturilor interatomice din structura metalelor nu sunt spațial orientate, atomii aflați la capătul straturilor pot aluneca de pe un strat pe altul dând astfel naștere deformației plastice. Proprietățile chimice ale metalelor depind tot de natura legăturilor lor atomice. Cu cât legăturile dintre atomi sunt mai puternice, și greu de rupt, cu atât materialul este mai inactiv. Deoarece interacțiunea dintre țesutul uman și biomaterial are loc la nivelul interfeței dintre cele două componente, proprietățile suprafeței materialului implantat sunt de mare importanță. Metalele în stare pură sunt mai rar utilizate, aliajele acestora fiind mai des folosite datorită faptului că îmbunătățesc unele dintre proprietăți, cum ar fi rezistența la coroziune și duritatea. Trei grupe de materiale domină grupa biomaterialelor metalice: oțelurile inoxidabile 316 L, aliajele de cobalt-crom-molibden și titanul pur sau aliaje de titan (tabelul 1). Primul tip de oțel inoxidabil folosit în implanturi a fost oțelul de vanadiu (18-8Va), dar rezistența la coroziune a acestuia nu a fost prea bună. Pentru a-i mări rezistența la coroziune, în compoziția acestuia s-a adăugat molibden (18-8Mo), care mai târziu a devenit oțelul inoxidabil 316. În anul 1950, componenta de carbon a oțelului inoxidabil 316 a fost redusă de la 0,08% la 0,03% din greutatea totală, cu scopul de creștere a rezistenței la coroziune. Astăzi, acest oțel poartă numele de **oțel inoxidabil 316L** și conține o cantitate de 0,03% carbon, 2% magneziu, 17-20% crom, 12-14% nichel, 2-4% molibden și alte elemente în cantități mai mici cum ar fi fosforul, sulfurul, și siliconul. Stratul pasiv (rezistent la coroziune) al acestor oțeluri nu este la fel de robust ca în cazul celor din aliaje de titan. Din această cauză, oțelurile inoxidabile sunt folosite doar la realizarea implanturilor medicale temporare cum ar fi șuruburile de fixare și tije ortopedice pentru fixarea fracturilor. Aceste oțeluri pot fi ecrusate prin prelucrare la rece. În cadrul procesului de fabricație al oțelurilor inoxidabile, tratamentele la cald sunt necesare înaintea celor la rece.

Procesul de ecrusare este bazat pe efectul inducerii unor tensiuni de compresie în suprafața piesei metalice printr-o sablare controlată. Prin acest tratament se mărește rezistența la îmbătrânire și, de asemenea, durata de viață a piesei.

Tabelul 1

Compoziția % a biomaterialelor metalice folosite în implanturile medicale.

Element	Oțel inoxidabil 316 L	Aliajul Co-Cr-Mo	Titan	Aliaj Ti-6Al-4V
C	0,03%	0,035%	0,010%	5,5-6,5%
Co	-	ponderat	-	0,08%
Cr	17-20%	26-30%	-	-
Fe	ponderat	0,75%	0,3-0,5%	-
H	-	-	0,0125-0,015%	0,25%
Mo	2-4%	5-7%	-	0,0125%
Mn	2%	1%	-	-
N	-	0,25%	0,03-0,05%	-
Ni	12-14%	1%	-	0,05%
O	-	-	0,18-0,40%	-
P	0,03%	-	-	0,13%
S	0,03%	-	-	-
Si	0,75	1%	-	-
Ti	-	-	ponderat	-
V	-	-	-	ponderat
W	-	-	-	3,5-4,5%

Aliajele pe bază de cobalt-crom-molibden conțin o cantitate ponderată de cobalt, 26-30% crom, molibden 5-7%, precum și alte elemente componente ca: carbonul, fierul, magneziu, azotul, nichelul și siliciul. Pe lângă cele două componente de bază se folosește molibdenul pentru obținerea unei structuri fine, care rezultă în urma proceselor de turnare și forjare. Cromul este folosit în acest aliaj ca un scut protector împotriva procesului de coroziune. Datorită proprietăților mecanice foarte bune (rezistența la oboseală, rezistența de rupere la tracțiune), aliajele pe bază de cobalt-crom-molibden se folosesc de regulă la fabricarea implanturilor ortopedice ce suportă solicitări foarte mari cum ar fi endoprotezele de șold și genunchi. De asemenea nici proprietățile abrazive (0,14 mm/an) precum și rezistența la coroziune foarte mare, ale acestor aliaje nu sunt de ignorat. Primele încercări de utilizare a **titanului** în implanturile medicale datează din anii 1930. Greutatea ușoară (4,5 g/cm³) precum și proprietățile mecano-chimice foarte bune ale titanului, fac din acesta un material foarte utilizat în cazul implanturilor ortopedice. Există patru categorii de titan folosite în aplicațiile medicale. Deosebiri dintre ele sunt date de impurități ca: oxigen, fier și nitrogen. În particular, oxigenul are o bună influență în cazul ductibilității și rezistenței mecanice. Pe lângă componentele prezentate mai sus se mai folosesc și alte componente ca: hidrogenul și carbonul (0,015% și respectiv 0,1%). De asemenea titanul are o rezistență foarte mare la coroziune, datorită formării unui strat de oxid de titan (TiO₂) pe suprafața acestuia. Această peliculă produce grăbirea procesului de osteointegrare, proces prin care țesutul osos aderă la suprafața implantului fără apariția inflamației cronice.

Dezavantajele titanului includ o rezistență la forfecare relativ mică, rezistență mică la uzură și dificultăți în procesul de fabricație.

Aliajele pe bază de titan și nichel au o proprietate neobișnuită și anume, dacă sunt deformate sub temperatura de transformare polimorfă, acestea revin la forma inițială odată cu creștere de temperatură. Unul dintre cele mai cunoscute aliaje pe bază de titan și nichel este aliajul Nitinol-55, care are în compoziția sa următoarele elemente: Ni și Ti în proporție de 50-55 %, precum și Co, Cr, Mn, și Fe. Acest tip de aliaj expune o serie de proprietăți de calitate cum ar fi o bună ductibilitate la temperatură joasă, o bună biocompatibilitate, rezistență la coroziune, rezistență la încărcare mecanică precum și proprietatea de conversie a energiei calorice în energie mecanică. Se folosește în

stomatologie (implanturile dentare), chirurgia reconstructivă (plăci craniene), chirurgia cardiacă (inimă artificială) și ortopedie (scoabe și șuruburi de fixare a fracturilor).

Modulul de elasticitate al materialelor prezentate este de cel puțin șapte ori mai mare decât cel al țesutului osos. Această neconcordanță poate duce la apariția fenomenului de „supraconsolidare”, o stare caracterizată prin reabsorbția osoasă în vecinătatea implantului. Complicațiile clinice apar datorită faptului că cea mai mare parte din solicitarea mecanică este preluată de către implant, privând țesutul osos de stimularea mecanică necesară procesului de homeostază. Proprietățile mecanice ale unui implant depind nu numai de tipul materialului folosit dar și de procesul defabricație, tratamentele termice și mecanice putând schimba microstructura materialului. De exemplu, în cazul prelucrării la rece (forjare sau cilindrare), deformările rezultate duc la o creștere adurității și a rezistenței materialului, dar din păcate scade ductibilitatea și crește reactivitatea chimică.

Transformările unei forme cristaline, stabilă la o anumită temperatură, într-o altă formă cristalină, stabilă la altă temperatură, se numesc transformări polimorfe. Transformarea polimorfă constă într-o modificare a pozițiilor reciproce, o regroupare, a particulelor care ocupă nodurile rețelei cristaline, la *temperatura de transformare polimorfă*, ca urmare a vibrației particulelor.

Biomateriale polimerice

Polimerii sunt cele mai folosite materiale în cadrul aplicațiilor medicale (tabelul 3). Aceste materiale pot fi folosite în realizarea de dispozitive cardiovasculare (grefe vasculare, valve artificiale ale inimii), implanturi mamare, lentile de contact, lentile intraoculare, învelișuri pentru medicamente, ațe chirurgicale, adezivi și substituenți pentru sânge. Polimerii sunt materiale organice, alcătuiți dintr-un număr mare de macromolecule, care de fapt formează legături covalente între atomi. Datorită naturii lor covalente a legăturilor intermoleculare, electronii sunt localizați între atomii constituenți, și polimerii consecvenți tind să aibă proprietăți termice și electrice scăzute. Cei mai utilizați polimeri, încă din anii 1960, sunt poliglicolidele (PGA) și polilactidele (PLA). Polilactidele sunt formate fie din monomeri stereo, monomerii de tip "D" și monomerii de tip "L", fie din combinația acestor doi (DL). Doar polimerii de tip "L" sunt de origine naturală. Polilactidele a căror monomeri predominanți sunt acei de tip "L" sunt polimeri semicristalini a căror timp de degradare este mai mare de doi ani. În celălalt caz, când monomerii predominanți sunt de tip "D", polimerii se găsesc în stare amorfă și sunt folosiți în cazul încapsulării medicamentelor datorită timpului rapid de degradare.

Tabelul 3

Exemple de aplicații medicale ale polimerilor.

Aplicații	Polimeri
Implanturi cardiovasculare	Polietilena, polivinil, policlorhidră, poliester, cauciuc siliconal, polietilenă, politetrafluoritilenă
Implanturi ortopedice	Polietilenă, polimetil, polimetacrilat,
Farmaceutică (medicamente)	Polilactite, policoglicolide
Țesuturi artificiale	Acid polilactic, acid poliglicoloc, polilactidă, policoglicolide

Comportamentul mecanic și termic al polimerilor este influențat de câțiva factori, incluzând compoziția chimică, structura lanțurilor polimerice, precum și masa atomică a moleculelor. Deformația plastică își face apariția atunci când forțele de acțiune mecanice cauzează alunecarea staturilor componente, unul față de celălalt. Schimbările în structura polimerului, menite să îmbunătățească rezistența la alunecare dintre straturi, fac ca rezistența mecanică a materialului să crească, dar scade plasticitatea materialului. De asemenea, crescând numărul de macromolecule componente, se ajunge tot la o mobilitate scăzută între straturi. Mecanismul de degradare al polimerilor cu o structură semicristalină se împarte în trei mari etape. În prima etapă, părțile amorfe sunt dizolvate de apă. Această dizolvare nu afectează rezistența mecanică a polimerilor. În cea de-a doua fază au loc

atacuri ale enzimelor asupra polimerului, iar cea de-a treia fază constă în eroziunea materialului. Factorii ce accelerează fenomenul de degradarea polimerilor sunt:

- factorul hidrofilic,
- factorul de cristalinitate,
- factorul de mărime.

Comparați cu metalele și ceramicile, polimerii au o rezistență mecanică mai mică precum și un modul de elasticitate mai mic, dar aceștia pot fi deformați până la o valoare mai mare înainte de rupere. În general, polimerii nu sunt folosiți în aplicațiile medicale în care să fie supuși la solicitări mecanice puternice (articulația artificială a șoldului, a genunchiului, a gleznei). Polietilena cu o densitate mare moleculară (UHMWPE) este o excepție de la această regulă, fiind folosită ca material de fricțiune în cazul protezei de șold și genunchi.

Biomateriale ceramice

Ceramicile sunt materiale în compoziția cărora intră materialele metalice și nemetalice, legate între ele prin legături ionice sau covalente. Ca și în cazul metalelor, legăturile interatomice din materialele ceramice sunt format în urma cristalizării tridimensionale a structurii. În contrast cu legăturile metalice, electronii din legăturile ionice sau covalente ale ceramicilor, sunt localizați între ioni/atomii constituenți. Ceramicile sunt izolatoare din punct de vedere electric și termic. Legăturile ionice sau covalente fac din ceramică un material cu o duritate mare și fragilitate ridicată, deoarece moleculele de atomi/ioni alunecă între ele. Aceste materiale sunt însă sensibile la apariția fisurilor sau alte defecte. Legăturile ionice/covalente ale materialelor ceramice au o mare influență în cazul comportării chimice a acestora. Ca biomateriale, materialele ceramice se găsesc sub numele de bioceramice și se pot clasifica în patru mari categorii:

- ceramice bioinerte sau neabsorbabile,
- ceramice absorbabile,
- ceramice bioactive.

Bioceramicele bioinerte nu sunt toxice, cancerigene, alergice, inflamatorii, și prezintă o bună comportare la coroziune. Din cadrul acestor ceramice face parte: alumina, zirconia, silicon nitridă și carbonul. Ele sunt de obicei folosite în cazul endoprotezelor de șold și a valvelor artificiale ale inimii.

Bioceramicele absorbabile se folosesc în cazul implanturilor degradabile, acestea fiind absorbite de corp. Din cadrul acestor bioceramice fac parte fosfați (calciu, tricalciu, aluminiu-calciu, zinc sulfat de calciu), oxizii (zinc-calciu-fosforos, fier-calciu-fosforos și corali (carbonat de calciu)).

Bioceramicele bioactive includ: biosticla, hidroxiapatitele și ceravitul (un amestec de oxid de silicon, calciu, sodiu, fosfor, magneziu și potasiu). O importantă aplicație a acestor bioceramice este cea de „îmbrăcare” a protezelor metalice, în special a celor de șold, pentru a permite țesutului uman să adere la suprafața protezei. Pe lângă această utilizare, bioceramicele reactive se mai folosesc și la protezele dentare, tije și șuruburi de fixare a fracturilor. Materialele ceramice nu sunt predispuse la coroziune chimică, ca în cazul materialelor metalice, dar sunt sensibile la alte forme de degradare, atunci când sunt expuse mediului fiziologic. Mecanismul și gradul de degradare depind în principiu de tipul materialului ceramic. Chiar și alumina, care este considerată în general un material bioinert, suferă modificări în cazul rezistenței mecanice, atunci când intră în contact cu un mediu salin. Ceramicile bioactive cât și materialele sticloase sunt degradabile în organismul uman. Chiar dacă aceste materiale au o degradare lentă, sau rapidă, ele pot fi reabsorbite de osteoclaste (celulele ce distrug în permanență țesutul osos), datorită asemănării particulelor de fosfat de calciu cu componentele minerale ale țesutului osos. Proprietățile de extensibilitate scăzute, precum și o fragilitate mare, fac ca materialele bioceramice să fie mai puțin folosite în aplicațiile medicale. De asemenea, rezistența la încovoiere, a ceramicilor, este foarte mică. Comportarea lor este mai bună în cazul supunerii la forțe de compresie (tabelul 6).

Tabelul 6

Proprietățile mecanice a celor mai folosite bioceramice.

Materiale	Modulul Young E [Gpa]	Rezistența la compresiune σ_c [Mpa]	Rezistența de rupere la tracțiune σ_T [Mpa]
Alumina	380	4500	350
Biosticla	22	500	56-83
Fosfat de calciu	40-117	510-896	69-193
Carbon pirolitic	18-28	517	280-560

Din toate materialele bioceramice, alumina are cele mai bune proprietăți mecanice, dar proprietățile sale, la alungire, rămân scăzute în comparație cu cele ale biomaterialelor metalice. Un avantaj al aluminei, este acela că are un coeficient de frecare scăzut și o rezistență mare la uzură. Datorită acestor proprietăți, alumina se folosește cu precădere în cazul suprafețelor de alunecare (încăzul endoprotezei de șold). Proprietățile mecanice scăzute ale fosfatului de calciu (hidroxiapatita) și a sticlei bioactive, facca acestea să nu poată fi folosite în cazul articulațiilor artificiale. Clinic, hidroxiapatita este folosită ca material de „umplură” în cazul defectelor de oase (osul urechii mijlocii, septul nazal). O altă întrebuințare a hidroxiapatitei este aceea de formare a unui strat pe implanturile metalice, pentru a amplifica procesul de osteoficare .

Biomateriale compozite

Compozitele sunt acele materiale care au în componență două sau mai multe faze constitutive, de obicei o matrice polimerică și o componentă de armare, la o scară mai mare decât cea atomică. De obicei, elementele componente ale unui material compozit sunt separate între ele prin interfețe care pot fi identificate fizic. Din punct de vedere structural, materialele biocompozite sunt materiale anizotrope, adică proprietățile lor mecanice diferă pe toate direcțiile. O primă clasificare a biocompozitelor se poate face după **natura elementelor componente**.

Există trei moduri de rigidizare a materialelor compozite:

- cu fibre scurte,
- cu fibre lungi,

•cu particule de material (pulbere). Fibrele utilizate ca materiale de armare pot fi de natură foarte diversă: bumbac, mătase, lână, celuloză, carbon, polimeri sintetici, metale etc. Ele trebuie să fie suficient de flexibile (pentru a permite prelucrarea materialului compozit prin procedee diverse) și să prezinte un raport mare lungime/diametru, care să permită preluarea eficientă a solicitării exterioare dinspre matrice spre materialul de armare. În general, adăugarea de fibre într-o matrice ductilă (polimerică sau metalică) urmărește creșterea rigidității materialului compozit, iar în cazul unei matrice fragile (de exemplu ceramica) vizează creșterea rezistenței. Una din clasele de umpluturi sub forma de particule dispersate sunt pulberile metalice (bronz, fier, argint, zinc etc.), care au ca principal rol creșterea conductibilității termice și conductivității electrice a materialelor polimerice, recunoscute tradițional ca având proprietăți izolatorii. De exemplu, prin introducerea de astfel de pulberi metalice în masa poliolefinelor se pot obține materiale cu o bună prelucrabilitate, capabile să asigure o ecranare eficientă împotriva radiațiilor electromagnetice și evitarea interferențelor. Aceste proprietăți sunt esențiale pentru protejarea dispozitivelor medicale și a aparaturii medicale în general, de funcționarea căreia depinde siguranța și calitatea vieții pacientului. Biocompozitele pot avea o matrice polimerică, metalică sau pe bază de materiale ceramice. Matricea are un dublu rol: să țină compacte fibrele/particulele utilizate ca sistem de armare și să realizeze transferul tensiunilor rezultate în cazul solicitărilor externe, către fibrele de armare. Proprietățile unui astfel de material compozit va depinde în acest caz nu numai de caracteristicile

intrinseci ale celor două elemente componente, dar și de aranjamentul spațial al fibrelor/particulelor în interiorul matricei și de gradul de adeziune matrice-fibre.

Câteva observații se impun:

1. Materialele compozite armate cu fibre lungi manifestă o anizotropie a proprietăților. Cu alte cuvinte, o parte din proprietățile materialului variază în funcție de direcția sau planul măsurării;

2. Obținerea unui material compozit armat cu proprietăți izotrope (modulul lui Young sau coeficientul de dilatare termică), este posibilă atunci când se folosesc fibre scurte sau materiale de armare dispersate (particule), cu condiția ca acestea să fie orientate aleatoriu în interiorul matricei. Acest deziderat nu este ușor de transpus în practică;

3. Există o gamă largă de materiale compozite cu aplicații medicale în care materialul de armare – fibre lungi sau țesături – sunt orientate în mod controlat pe anumite direcții privilegiate, pentru a induce anizotropia unora dintre proprietățile compozitului. Tipul de interfață dintre matrice și materialele de ranforsare are un rol primordial în stabilirea proprietăților materialului compozit. Prin definiție, interfața reprezintă zona/suprafața de separare dintre două regiuni la nivelul căreia au loc discontinuități ale unor proprietăți fizice, mecanice, chimice etc.

Câteva observații generale se impun a fi prezentate:

1. În cazul biomaterialelor compozite ce conțin fibre, interfața matrice/fibră este în general rugoasă și nu perfect plană.

2. Materialul matricei trebuie să „ude suprafața fibrei” (fenomen ce mărește implicit aria de contact dintre cele două faze). Pentru a se îmbunătăți gradul de udare al fibrelor, se folosesc agenți de cuplare.

3. Obținerea unor materiale compozite cu proprietăți optime, în special în ceea ce privește rezistența mecanică care este condiționată de felul în care solicitările mecanice se propagă la suprafața de separare matrice-fibră. Un bun transfer al tensiunilor de la matrice la fibră presupune o suprafață mare de contact și o foarte bună adeziune. O adeziune scăzută între matrice și fibre duce la apariția și propagarea rapidă a fisurilor în interiorul compozitului.

4. Adeziunea dintre matrice și materialul de ranforsare poate fi realizată prin legături de tip vander Waals (adeziune slabă), dar și prin legături covalente puternice.

5. Suprafața totală de contact dintre matrice și fibre poate merge până la valori de $3000 \text{ cm}^2/\text{cm}^3$.

O altă clasificare se poate face în funcție de **modul de biodegradare**:

- absorbabile în întregime,
- parțial absorbabile,
- neabsorbabile.

Biocompozitele total absorbabile sunt realizate din fibre și o matrice generală, ambele fiind absorbabile. Aceste materiale sunt folosite cu precădere în cazul fixării fracturilor (șuruburi sau tije), fără a fi necesar ca după vindecarea țesutului osos aceste dispozitive de fixare să fie extrase, ele fiind absorbite de organism. Cel mai utilizat material compozit absorbabil este grupul de polimeri ai acidul polilactic (PLA), din mai multe considerente pozitive:

- materialul este în totalitate biodegradabil cu o rată de absorbție ce poate fi controlată prin modificarea masei moleculare;
- produșii rezultați în urma degradării nu sunt toxici pentru organism, sunt biocompatibili și sunt ușor metabolizați. Principalul dezavantaj al acestor biocompozite este modul de coordonare a procesului de degradare a componentelor.

Biocompozitele parțial absorbabile sunt realizate din materiale de rigidizare neabsorbabile și materiale matrice absorbabile. Istoric vorbind, aceste materiale au fost predecesorii materialelor biodegradabile. În general, cele mai utilizate compozite parțial absorbabile în aplicațiile medicale sunt: polimetilmetacrilat (PMMA) și poli(butilen tereftalat) (PBT) ca matrice neabsorbabile în combinație cu hidroxiapatita (HA) sau acidul polilactic (PLA); polihidroxibutirat (PHB) ca matrice neabsorbabilă în combinație cu alumina sau carbonatul de calciu ca și componente biodegradabile.

În cazul **biocompozitelor neabsorbabile**, ambele componente, cea generală (matricea) și cea de rigidizare (particule sau fibre) sunt neabsorbabile. Acestea sunt în general folosite pentru a asigura proprietăți mecanice și clinice care nu pot fi obținute cu biomaterialele tradiționale. Astăzi, materialele compozite neabsorbabile sunt folosite pentru realizarea dispozitivelor de fixare

avertebrelor spinale, în cazul endoprotezelor de șold și genunchi, în cazul implanturilor dentare, datorită proprietăților mecanice stabile pe care le conferă implantului. Majoritatea țesuturilor biologice (țesutul osos, dentina, colagenul, cartilajul, pielea) sunt considerate materiale compozite. În general țesuturile sunt împărțite pe două categorii: țesuturi dure și țesuturi moi. Țesutul osos și țesutul dinților sunt singurele exemple de țesuturi dure, iar pielea, vasele de sânge, cartilajele și ligamentele sunt câteva exemple de țesuturi moi. După cum se știe, țesuturile dure sunt în general mai rigide (cu un modul de elasticitate ridicat) și mai dure decât țesuturile moi. Cu toate acestea, materialele prezentate mai sus sunt compozite naturale cu proprietăți anizotrope, care depind de rolul și aranjamentul structural al componentelor țesuturilor (colagenul, elastina, hidroxiapatita). Anizotropia proprietăților elastice ale țesuturilor biologice trebuie să constituie criteriul de bază pentru proiectarea implantelor medicale realizate din materiale compozite.

Principala caracteristică a materialelor compozite este aceea că, variind faza de rigidizare se poate obține o gamă largă de proprietăți mecanice și biologice. Din punct de vedere mecanic, materialele metalice și cele ceramice par să fie cea mai bună alegere pentru aplicațiile medicale în cazul țesuturilor biologice dure, în timp ce polimerii pot fi folosiți în cazul țesuturilor biologice moi. După cum se poate observa în cele două tabele, modulul de elasticitate al metalelor și al ceramicelor sunt de 10-20 de ori mai mare decât cel al țesuturilor dure. Astfel, implanturile fabricate din aceste materiale tind să fie mult mai rigide decât țesuturile adiacente. În ortopedie, această nepotrivire de rigiditate dintre țesutul osos și implanturile metalice sau ceramice influențează distribuția tensiunilor de solicitare între cele două componente. Deoarece tensiunea de solicitare este invers proporțională cu rigiditatea elementelor, țesutul osos este mai puțin solicitat față de implant. După spusele lui Wolff, cu cât tensiunile de solicitare sunt mai mici cu atât gradul de remodelare al țesutului osos se accentuează, ceea ce duce la o densitate osoasă mai mică ceea ce înseamnă afectarea arhitecturii osoase. În osteosinteză, acest fapt poate afecta procesul de vindecare al oaselor și poate crește riscul aparițiilor de fracturi, fie în zona de legătură os-implant fie în altă zonă. Dacă echilibrul rigidității este atins atât de implant cât și de țesutul osos, riscul aparițiilor efectelor negative este foarte mic. În această privință, folosirea unor materiale (polimeri) cu un modul de elasticitate scăzut pare să fie o soluție bună. Totuși, rezistența mică asociată cu un modul de elasticitate scăzut diminuează șansele de utilizare a materialului în scopuri medicale. Modulul de elasticitate ridicat și rezistența mecanică mare a materialelor polimerice compozite au făcut din acestea unele dintre cele mai folosite materiale în ortopedie. Un alt avantaj al materialelor compozite ar fi acela că, variind volumul fracționat și cantitatea de materiale de rigidizare se pot obține proprietăți ale implantului care să fie tolerate de țesuturile gazdă. De asemenea, s-a demonstrat faptul că materialele compozite au biocompatibilitate structurală mult mai bună decât cea a materialelor monolitice. Materialele compozite mai oferă și alte avantaje în detrimentul materialelor metalice și ceramice și anume: absența fenomenului de coroziune, lipsa eliberării ionilor metalici ce sunt foarte dăunători organismului, o rezistență mai mare la rupere și o rezistență mai mare la oboseală.

BIOCOMPATIBILITATEA MATERIALELOR CU ORGANISMUL UMAN

Clasa biomaterialelor se deosebește de celelalte clase de materiale prin criteriul de **biocompatibilitate**, care se definește ca fiind proprietatea biomaterialelor, prin care, în urma implantării lor într-un organism viu, nu produc reacții adverse și sunt acceptate de țesuturile ce le înconjoară. Așadar, biomaterialul trebuie să nu prezinte toxicitate sau să nu producă reacții inflamatorii, atunci când este introdus în organismul uman ca și implant. Cercetătorii Wintermatel și Mayer (1999) au extins definiția biocompatibilității și au ajuns la separarea acesteia în două categorii : **biocompatibilitatea intrinsecă** și **biocompatibilitatea extrinsecă** (funcțională). Prin biocompatibilitatea intrinsecă se înțelege faptul că suprafața implantului trebuie să fie compatibilă cu țesutul gazdă din punct de vedere chimic, biologic și fizic (incluzând morfologia suprafeței). În ceea ce privește biocompatibilitatea extrinsecă, acesta se referă la proprietățile mecanice ale materialului, cum ar fi modulul de elasticitate, caracteristicile de deformare și transmiterea optimă a solicitărilor la

interfața dintre implant și țesut. Condiționarea optimă dintre biomaterial și țesutul viu este atinsă atunci când compatibilitatea suprafeței și cea structurală sunt îndeplinite.

Biocompatibilitatea unui implant depinde de numeroși factori ca : starea generală de sănătate a pacientului, vârsta, permeabilitatea țesutului, factori imunologici și caracteristicile implantului (rugozitatea și porozitatea materialului, reacțiile chimice, proprietățile de coroziune, toxicitatea acestuia). Din punct de vedere chimic, materialele biocompatibile trebuie să fie stabile și să aibă o bună rezistență la coroziune, având în vedere particularitățile solicitărilor la care sunt supuse în corpul uman:

- compoziția mediului intern variază continuu, având un caracter de la bazic la acid; are loc și o coroziune microbiologică, imposibil de estimat în condiții de laborator;

- în funcție de destinație, unele materiale sunt supuse solicitărilor mecanice constante, generând coroziunea sub tensiune, respectiv ciclice, caz în care apare coroziunea laoboseală;

- la aliajele dentare apare pregnant fenomenul coroziunii electrochimice. Din punct de vedere fizic, o mare importanță o are conductivitatea termică. Datorită lipsei electronilor liberi, țesuturile au o conductibilitate termică mică, ceea ce duce la evitarea șocurilor termice. De aceea, materialele biocompatibile sunt cu atât mai bune cu cât conductivitatea lor termică este mai mică. Pentru realizarea acestui deziderat, între implant și țesut se poate introduce un izolator termic. În țesuturile umane, o importanță deosebită o prezintă desfășurarea proceselor de coroziune electrochimică în ser sanguin la temperatura de 37°C. Aceste procese de coroziune electrochimică prezintă, pentru diferite materiale metalice, următorul șir de valori ale potențialului ABE (Anodic Back Electromotive Force – forță electromotoare anodică de reacție).

Din acest punct de vedere, se consideră că limita de biocompatibilitate se situează în jurul unui potențial ABE de 300 mV. După cum se poate observa din tabelul de mai sus, materialul cu cel mai înalt potențial ABE este titanul, urmat de niobiu, tantal, tantal și platină. Dar, pe lângă un potențial ABE înalt, metalele biocompatibile trebuie să îndeplinească și alte cerințe.

Astfel, cercetări citologice asupra unor culturi de celule vii în ceea ce privește eventuala toxicitate a materialelor metalice au arătat că, din cele aproximativ 70 de metale ale sistemului periodic al elementelor, doar 5 sunt tolerate de către celule, fără a avea loc o încetinire a dezvoltării acestora. Astfel, sunt considerate netoxice: titanul, tantalul, zirconiu și limitat niobiul. Vitalitatea celulelor se conservă, deoarece și oxizii sau eventualii produși de coroziune ai acestor metale sunt netoxici. La celălalt pol se situează metalele cu o acțiune puternic nocivă sub acest aspect, cum sunt: cobaltul, nichelul, cuprul, vanadiul și stibiul. Din tabelul 10 se poate observa faptul că titanul prezintă proprietăți favorabile, atât din punct de vedere fizico-chimic, cât și mecanic.

Proprietățile și aplicațiile biomaterialelor în medicină

Clasa biomaterialelor se deosebește de celelalte clase de materiale prin criteriul de biocompatibilitate, care se definește ca fiind proprietatea biomaterialelor, prin care, în urma implantării lor într-un organism viu, nu produc reacții adverse și sunt acceptate de țesuturile ce le înconjoară. Așadar, biomaterialul trebuie să nu prezinte toxicitate sau să nu producă reacții inflamatorii, atunci când este introdus în organismul uman ca și implant.

Cercetătorii Wintermatel și Mayer (1999) au extins definiția biocompatibilității și au ajuns la separarea acesteia în două categorii: biocompatibilitatea intrinsecă și biocompatibilitatea extrinsecă (funcțională). Prin biocompatibilitatea intrinsecă se înțelege faptul că suprafața implantului trebuie să fie compatibilă cu țesutul gazdă din punct de vedere chimic, biologic și fizic (incluzând morfologia suprafeței). În ceea ce privește biocompatibilitatea extrinsecă, aceasta se referă la proprietățile mecanice ale materialului, cum ar fi modulul de elasticitate, caracteristicile de deformare și transmiterea optimă a solicitărilor la interfața dintre implant și țesut.

Condiționarea optimă dintre biomaterial și țesutul viu este atinsă atunci când compatibilitatea suprafeței și cea structurală sunt îndeplinite.

Biocompatibilitatea unui implant depinde de numeroși factori ca : starea generală de sănătate a pacientului, vârsta, permeabilitatea țesutului, factori imunologici și caracteristicile implantului

(rugozitatea și porozitatea materialului, reacțiile chimice, proprietățile de coroziune, toxicitatea acestuia).

Proiect 1. Aliaje biodegradabile pe bază de Mg pentru implanturi ortopedice (Acronim - ORTOMAG), responsabil Șef lucr. Dr. Eusebiu Viorel Șindilar

Primele aliajele biodegradabile pe bază de Mg au fost realizate din Magneziu, 0,5 Calciu și, în cantități variabile din Zirconiu, astfel:

Mg 0,5 Ca 0,5 Zr (Zr 1.1)

Mg 0,5 Ca 1,0 Zr (Zr 1.2)

Mg 0,5 Ca 1,5 Zr (Zr 1.3)

Mg 0,5 Ca 2,0 Zr (Zr 1.4)

Mg 0,5 Ca 3,0 Zr (Zr 1.5)

Fiecare aliaj a fost implantat la un lot de patru șobolani, pe partea stângă, în două regiuni distincte, în regiunea lombară, subcutanat și în regiunea femurală.

S-au folosit piese paralelipipedice, cu marginile rotunjite cu dimensiuni cuprinse între: lungime = 1,00-1,30 mm, lățime = 0,40 – 0,60 mm și o grosime de 0,1-0,2 mm.

Biodegradabilitatea aliajelor folosite a fost apreciată cu ajutorul examenelor clinice și de laborator care au urmărit în timp: reacția tisulară, aspectele imagistice (RX și CT) și histopatologice.

Reacția tisulară pentru aliajele cu Zr a fost urmărită prin examene clinice utilizând metodele semiologice de examinare generale.

În primele 24 de ore după intervenția chirurgicală s-a constatat reacție locală de intensitate diferită atât în regiunea lombară cât și în cea femurală. Eliberarea de hidrogen gazos care se formează în timpul degradării aliajului cu Zr a avut loc imediat după implantare la toate cele cinci loturi. Hidrogenul gazos a fost în cantitate mai mare în aliajele Zr 1.2, Zr 1.3 și Zr 1.4, nu a afectat în mod semnificativ funcționalitatea fiziologică a țesutului înconjurător.

Examele radiologice (fig. 1.12-1.16) au pus în evidență prezența aliajului implantat și volumul de hidrogen gazos în cantități variabile de la nivelul regiunilor lombare și femurale (A – prezentare dorso-ventrală, B- prezentare latero-laterală).

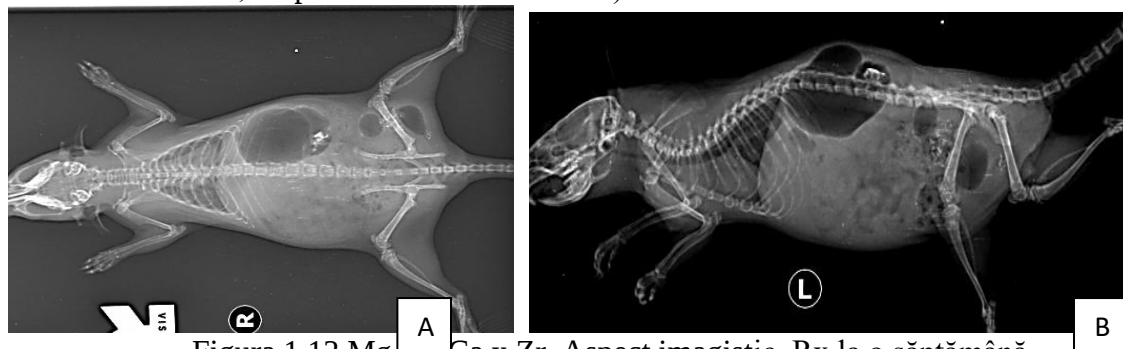


Figura 1.12 Mg 0,5 Ca x Zr Aspect imagistic, Rx la o săptămână

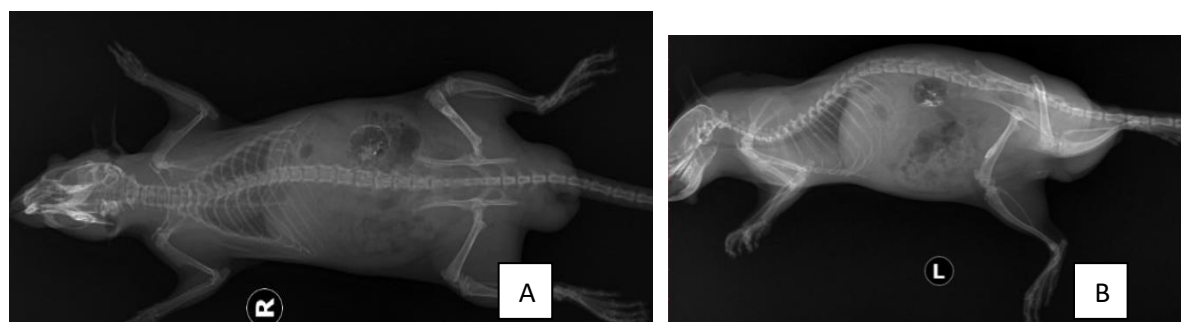


Figura 1.13 Mg 0,5 Ca x Zr Aspect imagistic, Rx la o lună

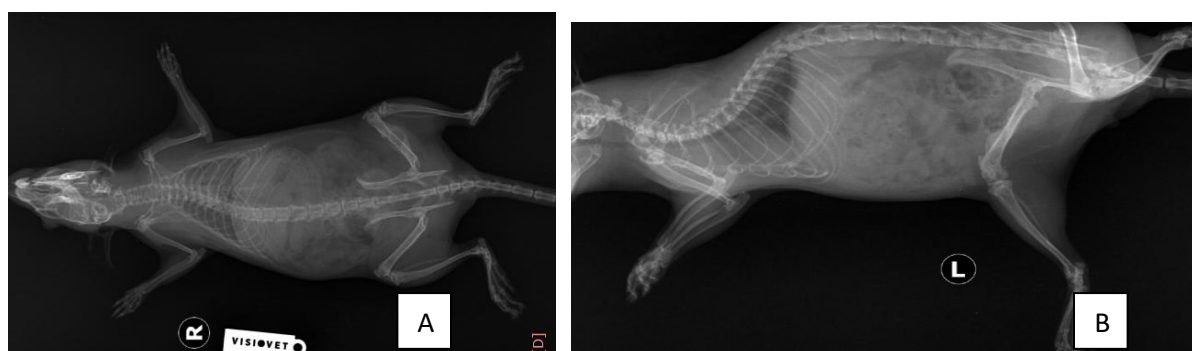


Figura 1.14 Mg 0,5 Ca x Zr Aspect imagistic, Rx la două luni

Examenenele imagistice, CT (fig. 1.17-1.20) au pus în evidență prezența aliajului și a volumului de hidrogen gazos dela nivelul regiunii lombare (A) și femurale (B), în cantități variabile.

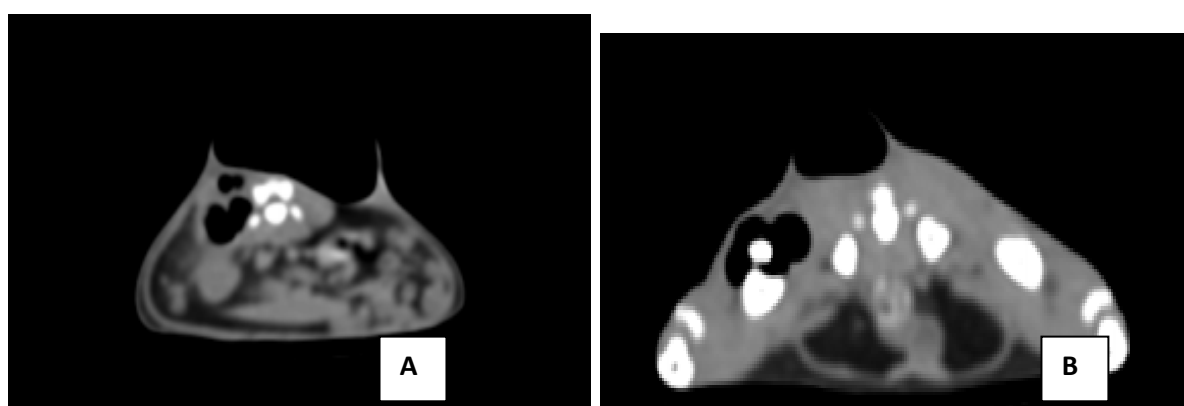


Figura 1.17 Mg 0,5 Ca x Zr Aspect imagistic, CT la 1 săptămână

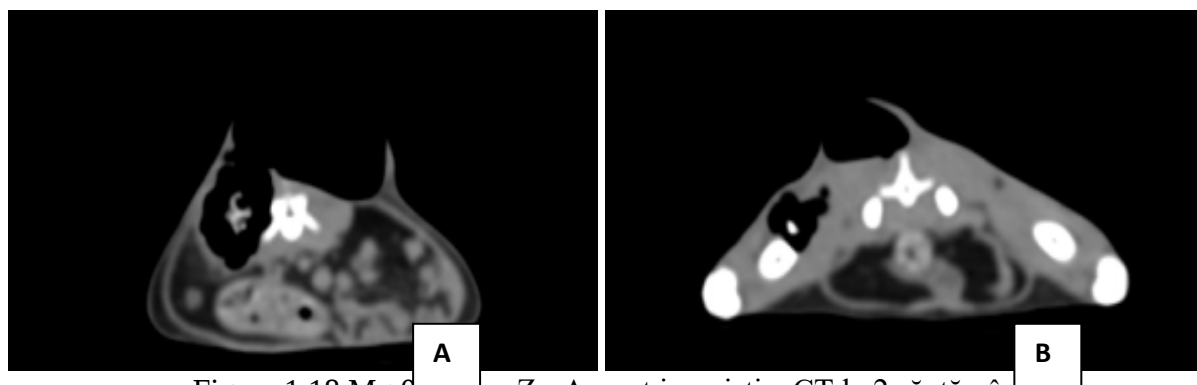


Figura 1.18 Mg 0,5 Ca x Zr Aspect imagistic, CT la 2 săptămâni

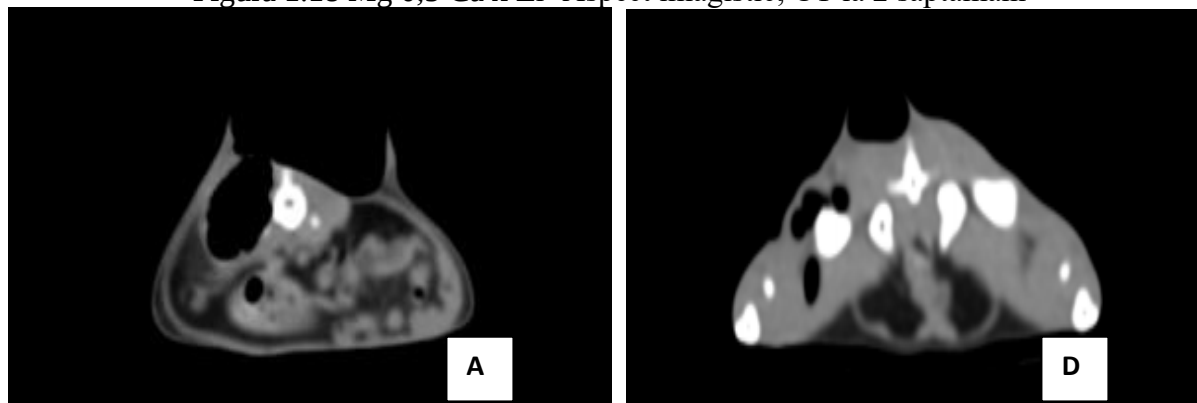


Figura 1.19 Mg 0,5 Ca x Zr Aspect imagistic, CT la o lună

Reacția tisulară pentru aliajele cu Zirconiu a fost urmărită prin examene histologice utilizând colorați tricromică Masson. Pentru a putea evalua din punct de vedere histopatologic reacția tisulară la toate animalele din loturile supuse experimentării chirurgicale. Acestea au fost eutanasiate după un protocol bine stabilit, astfel ca, dela început și până la final, să putem evalua gradul de biocompatibilitate, dar și de resorbție al materialului implantat.

Examine histologice efectuate la o săptămână au pus în evidență reacția inflamatorie de intensitate medie, fiind reprezentată de prezența macrofagelor și neutrofilelor în jurul materialului implantat, cât și de o reacție periferică evidențiată prin hiperplazia fibroblastelor și a fibrelor de collagen. Sunt prezente mici spații goale în jurul materialului implantat datorate acumulărilor de gaz provenite din resorbția materialului.

2. Următoarele aliajele biodegradabile pe bază de Mg au fost realizate din Magneziu, 0,5Calciu și, în cantități variabile Ytriu; astfel:

Mg 0,5Ca 0,5Y (Y 2.1)

Mg 0,5Ca 1,0Y (Y 2.2)

Mg 0,5Ca 1,5Y (Y 2.3)

Mg 0,5Ca 2,0Y (Y 2.4)

Mg 0,5Ca 3,0Y (Y 2.5).

Fiecare aliaj a fost implantat la un lot de patru șobolani, în partea stângă, în două regiuni distincte, în regiunea lombară, subcutan (fig. 2.1 și în regiunea femurală. S-au folosit piese paralelipipedice, cu marginile rotunjite cu dimensiuni cuprinse între: lungime = 1, 00-1.30 mm, lățime = 0,40 – 0,60 mm și o grosime de 0,1-0,2 mm.

Biodegradabilitatea aliajelor folosite a fost apreciată cu ajutorul examenelor clinice și de laborator care au urmărit în timp: reacția tisulară, parametrii hematologici, aspectele imagistice (RX și CT) și histogice.

Reacția tisulară pentru aliajele cu Y a fost urmărită prin examene clinice utilizând metodele semiologice de examinare generale

În primele 24 de ore după intervenția chirurgicală s-a constatat reacție locală de intensitate diferită atât în regiunea lombară cât și în cea femurală.

Eliberarea de hidrogen gazos care se formează în timpul degradării aliajului cu Y a avut loc imediat după implantare în toate cele cinci grupuri. Hidrogenul gazos a fost în cantitate mai mare în aliajele Y 2.2, Y 2.3 și Y 2.4, nu a afectat în mod semnificativ funcționalitatea fiziologică a țesutului înconjurător.

Examele radiologice (fig. 2.9-2.11) au pus în evidență prezența aliajului implantat și volumul de hidrogen gazos în cantități variabile dela nivelul regiunilor lombare și femurale (A – prezentare dorso-ventrală, B- prezentare latero-laterală).

Examele imagistice CT (fig. 2.12-2.15), au pus în evidență prezența aliajului implantat și volumul de hidrogen gazos în cantități variabile dela nivelul regiunilor lombare (A) și femurale (B).

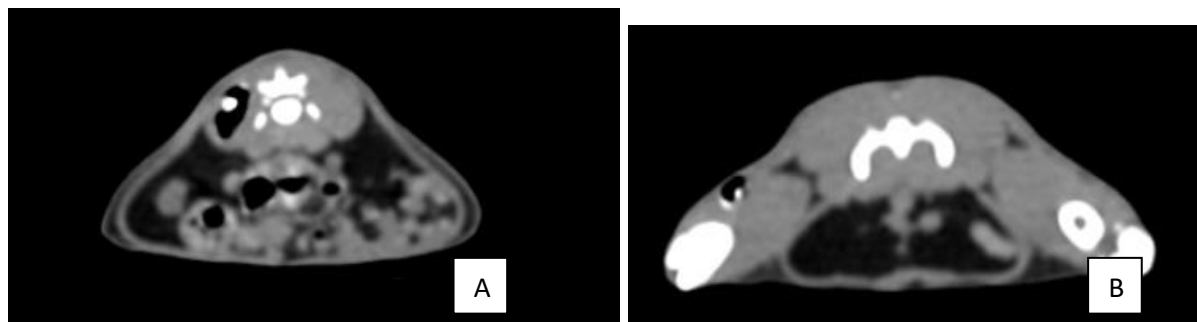


Figura 2.12 Mg 0,5 Ca x Y Aspect imagistic, CT la 1 săptămână

Reacția tisulară a fost urmărită prin examene histologice utilizând colorația tricromică Masson. Pentru a putea evalua din punct de vedere histopatologic reacția tisulară la toate animalele din loturile care au fost supuse experimentării chirurgicale, acestea au fost eutanasiate treptat după un protocol bine stabilit, astfel ca, de la început și până la final să putem evalua gradul de biocompatibilitate și de resorbție al materialului implantat.

Examele histopatologice au pus în evidență pentru aliajele cu Ytriu o reacție inflamatorie reprezentată de prezența de macrofage, fibroblaste și fibre de collagen.

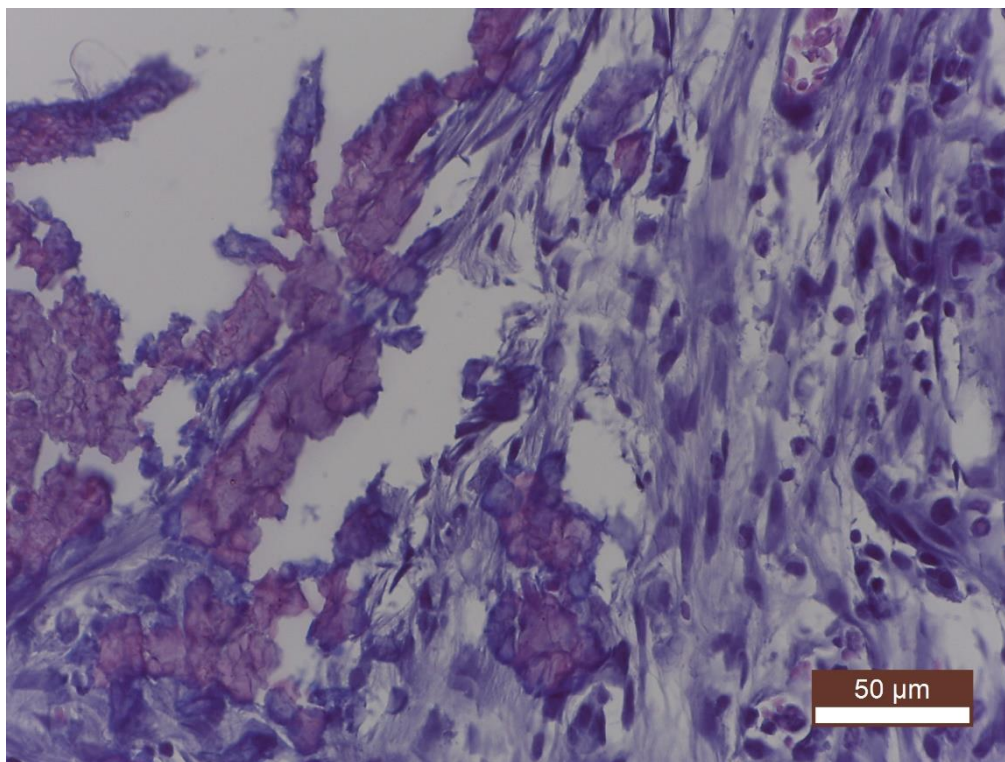


Figura 2.16 Mg 0,5 Ca x Y Reacție inflamatorie moderată, rare macrofage, fibroblaste și fibre de collagen. Col. tricromică Masson

Examele histologice realizate la o lună au pus în evidență resorbție intensă a materialului implantat și prezenta în spații intratissulare vacuolare mari, ocupate, de gazele rezultate din descompunerea/resorbția tisulară a materialului utilizat.

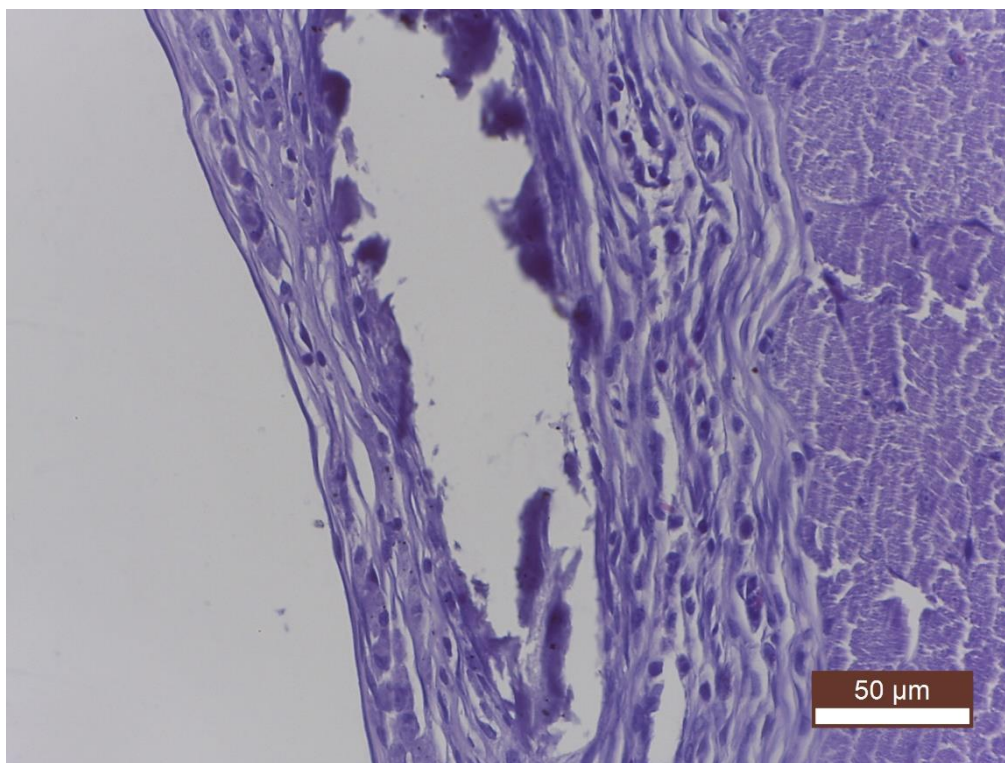


Figura 2.20 Mg 0,5 Ca x Y Spatii intratisulare vacuolare mari rezultate din descompunerea/resorbția tisulară a materialului utilizat Col. tricromica Masson

Biocompatibilitatea tisulară superioară a materialului implantat s-a evidențiat prin lipsa procesului inflamator și prin țesutul conjunctiv peri-implant.

3. Al treilea lot de aliajele biodegradabile pe bază de Mg au fost realizate din Magneziu, 0,5Calciu și, în cantități variabile din Mangan, astfel:

Mg 0,5Ca 0,5Mn (Mn 3.1)

Mg 0,5Ca 1,0Mn (Mn 3.2)

Mg 0,5Ca 1,5Mn (Mn 3.3)

Mg 0,5Ca 2,0Mn (Mn 3.4)

Mg 0,5Ca 3,0Mn (Mn 3.5)

Fiecare aliaj a fost implantat la un lot de patru șobolani, pe partea stângă, în două regiuni distincte, în regiunea lombară (fig 3.1), subcutanat și în regiunea femurală (fig. 3.2).

S-au folosit piese paralelipipedice, cu marginile rotunjite cu dimensiuni cuprinse între: lungime = 1,00-1.30 mm, lățime = 0,40 – 0,60 mm și o grosime de 0,1-0,2 mm.

În primele 24 de ore după intervenția chirurgicală s-a constatat reacție locală de intensitate diferită atât în regiunea lombară cât și în cea femurală.

Eliberarea de hidrogen gazos care se formează în timpul degradării aliajului cu Mn a avut loc imediat după implantare în toate cele cinci loturi examinate. Hidrogenul gazos a fost în cantitate mai mare în aliajele Mn 3.3, Mn 3.4 și Mn 3.5, dar nu a afectat în mod semnificativ funcționalitatea fiziologică a țesutului înconjurător.

Examele radiologice (fig. 3.3 – 3.6) au pus în evidență prezența aliajului și a volumului de hidrogen gazos la nivelul regiunii lombare și femurale în cantități variabile

Examele CT (fig. 3.7-1.20) au pus în evidență prezența aliajului și a volumului de hidrogen gazos la nivelul regiunii lombare (A) și femurale (B), în cantități variabile.

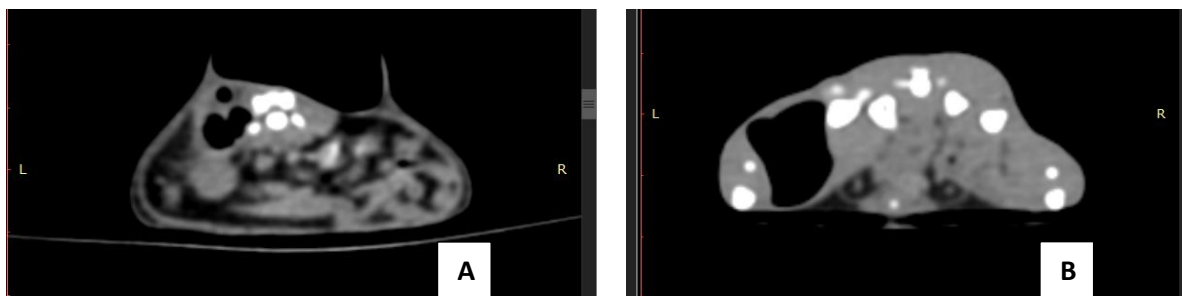


Figura 3.7 Mg 0,5Ca xMn Aspect imagistic, CT la 1 săptămână

Reacția tisulară a fost urmărită prin examene histologice utilizând colorația tricromică Masson. Toate animalele din loturile care au fost supuse experimentării chirurgicale au fost eutanasiate după un protocol bine stabilit, astfel ca, de la început și până la final să putem evalua gradul de biocompatibilitate și de resorbție al materialului implantat.

Examele necropsice au pus în evidență prezența depozitelor de hidrogen gazos peri-implant de la nivelul regiunii lombare (fig. 3.11A) și femurale.

Examele histopatologice au pus în evidență reacția inflamatorie pronunțată, cu prezența de macrofage și neutrofile în jurul materialului implantat, cât și o reacție periferică importantă tradusă prin hiperplazia fibroblastelor și a fibrelor de collagen. Sunt prezente în jurul materialului implantat spații goale corespunzătoare, acumulărilor de gaz provenite din resorbția materialului.

Examele histopatologice au pus în evidență reacția inflamatorie pronunțată, cu prezența de macrofage și neutrofile în jurul materialului implantat, cât și o reacție periferică importantă tradusă prin hiperplazia fibroblastelor și a fibrelor de collagen. Sunt prezente în jurul materialului implantat spații goale corespunzătoare, acumulărilor de gaz provenite din resorbția materialului.

Exame histologice realizate la o săptămână au pus în evidență pentru toate aliajele implantate reacția inflamatorie intensă, fiind reprezentată de prezența macrofagelor și neutrofile în jurul materialului implantat, cât și de o reacție periferică importantă tradusă prin hiperplazia fibroblastelor și a fibrelor de collagen. Sunt prezente în jurul materialului implantat spații goale corespunzătoare, acumulărilor de gaz provenite din resorbția materialului. Zone de material implantat resorbit parțial, delimitate de o reacție fibroasă periferică; vacuole mari delimitate de țesutul conjunctiv neoformat în apropierea materialului.

Examele histologice realizate la o lună au pus în evidență o resorbție mai intensă a materialului implantat și prezenta în spații intratisulare vacuolare mari, ocupate, de gaze rezultate din descompunerea/resorbția tisulară a materialului utilizat pentru aliajele cu Mn comparative cu cele cu Zirconiu și Ytriu.

Examele histologice realizate la două luni pentru aliajele cu Zirconiu și Ytriu au evidențiat biocompatibilitate a materialului implantat, evidențiată prin lipsa procesului inflamator și prin țesutul conjunctiv peri-implant. Resorbție importantă a materialului implantat cu eliberare de gaze (spații goale delimitate de țesut conjunctiv) și inflamație subacută-cronică periferică pentru aliajele cu Ytriu comparative cu cele cu Zirconiu.

Proiect 2. “Aliaje biocompatibile pe bază de titan pentru protetica medicală din sisteme complexe microaliate – BioTIT” Responsabil Proiect, Sef lucr. dr. Mihaela-Claudia SPATARU

Metoda de lucru utilizată privind testarea „in vivo”

Experimentul s-a desfășurat în cadrul Facultății de Medicină Veterinară Iași, constând în testarea biocompatibilității unor aliaje Ti-Mo și TiMoSi în diferite procente de concentrație pe specia *Ovis aries*, utilizând exemplare de femele adulte.

Exemplele au fost cazate în cadrul Spitalizării FMV Iași pe o perioadă de 2,5 luni, perioada derulării experimentului, asigurându-se condițiile de cazare, igienă și alimentație corespunzătoare, conform Directivei EU 60/2010 și a Legii 43/2014 privind protecția animalelor utilizate în scopuri științifice completată de Legea 199/2018, a Normei sanitar veterinare privind protecția animalelor de fermă, aprobată prin Ordinul președintelui Autorității Naționale Sanitare Veterinare și pentru Siguranța Alimentelor nr. 75/2005, de Norma sanitară veterinară ce stabilește standarde minime pentru protecția vițelilor, aprobată prin Ordinul președintelui Autorității Naționale Sanitare Veterinare și pentru Siguranța Alimentelor nr. 72/2005, aprobată prin Ordinul președintelui Autorității Naționale Sanitare Veterinare și pentru Siguranța Alimentelor nr. 202/2006, cu modificările și completările ulterioare.

Legea 43/2014 privind protecția animalelor utilizate în scopuri științifice completată de Legea 199/2018 prevede ca la ovinele între 30-60 kg să fie asigurată densitatea optimă de 1,5 m²/animal, înălțimea optimă a boxelor să fie de 1,2 m (Art 32, alin 6) iar apa să fie administrată ad-libidum în recipiente care să permită accesul nelimitat al tuturor animalelor conform Art 12, alin 3, Art 32, alin 1, 2 și normele prevăzute la Anexa nr 3 din Legea 43/2014 privind protecția animalelor utilizate în scopuri științifice. De asemenea, numărul de animale utilizat în experiment respectă principiul reducerii animalelor implicate în experiment conform Art 12, alin 2, lit. A din Legea 43/2014.

Metodele de prelevare a probelor biologice au produs un stres minim animalelor conform Art 12, alin 3, lit. b, c, iar procedura de implantare a aliajelor s-a făcut sub anestezie conform Art 13, alin 2. din Legea 43/2014 privind protecția animalelor utilizate în scopuri științifice.

Animalele au fost plasate în carantină profilactică pentru o perioadă de 14 zile, urmărindu-se permanent starea de sănătate, neînregistrându-se nicio modificare de la statusul normal conform Art. 5 din Legea 43/2014 privind protecția animalelor utilizate în scopuri științifice

La finalul experimentului, animalele au fost eutanasiate conform Art. 22, din Legea 43/2014 prin trankilizare, conform prevederilor din Art 5 al legii.

Tehnica de aplicare a implanturilor s-a efectuat după un protocol chirurgical specific.

Loturile de oi supuse experimentului au fost cântărite, înregistrându-se greutatea, animalelor care a variat între 38 și 50 kg, acest aspect fiind extrem de important în dozarea anestezicului administrat. Liniștea operatorie s-a asigurat cu preparatul Xilazină, 0,5 mg/kgcorp.

Tehnica de lucru:

Instrumentarul utilizat a fost necesar pentru efectuarea inciziilor (bisturiu cu lamă detașabilă), a hemostazei (pense hemostatice), decolării periostului (decolator de periost), a formării canalului de implantare (freză electric de ortopedie), suturilor (ace chirurgicale, fire resorbabile și ață chirurgicală)

În regiunea tibială cranial s-a executat o incizie de aproximativ 4 cm la nivelul pielii și a țesutului conjunctiv subcutanat și a fasciei regionale. Periostul a fost incizat cu bisturiul după care a fost decolat pe o distanță de 0,5 cm cu ajutorul decolatorului de periost (Fig. 2) Cu ajutorul frezei electrice ortopedice s-a incizat țesutul osos tibial printr-o dublă incizie în felie de pepene de aproximativ 2-3 mm lățime, 8-10 mm lungime și 0,8-10 mm adâncime.



Fig. 1. Secționarea periostului



Fig. 2. Decolarea periostului de pe compacta

osoasă

Periostul a fost repositionat peste breșa de implant (fiind osteogeneratoare), marginile au fost suturate cu fir resorbabil în vederea asigurării continuității și a contenționării implantului în breșa (Figg. 3, 4). Plaga cutanată a fost suturată cu fir sintetic neresorbabil în fire separate, fiind eliminate după cicatrizarea plăgii la 14 zile după intervenție.

Animalele au fost cazate într-un adăpost igienic și au fost inspectate zilnic în vederea evaluării procesului de cicatrizare. Pentru prevenirea dezvoltării unor procese inflamatorii, fiecărui animal i-au fost administrate antibiotice, *eritromicină* fp 5 %, timp de 5 zile, în doză de 4 mg s.a./kg g.c./zi, utilizându-se 2 flacoane.

La majoritatea indivizilor, procesul de cicatrizare a avut o evoluție favorabilă, la 1 individ a dezvoltat un proces purulent subcutan care a fost drenat după 15 de zile de la intervenție, neobservându-se afectarea semnificativă a stării generale.

Imediat după implantare, la 1 lună și la 2 luni după implantare (la sfârșitul experimentului) s-au efectuat radiografii prin care s-a urmărit reacția țesuturilor din jurul implantului în vederea monitorizării reacției "in vivo" a implanturilor cu structurile biologice active.

Radiografiile s-au realizat cu aparatul Intermedical Basic 4006 – acest aparat este mobil și poate executa radiografii în incidente diverse datorită brațului cu mobilitate mare, inclusiv a tubului radiogen care se poate fixa în diferite unghiuri și în următoarele incidente: medio-laterală și cranio-caudală. Pentru această regiune s-au aplicat parametric cu următoarele valori (ușor variabile în funcție de tensiune cu valori cuprinse între 48-52 kV și cu intensitate cu valori cuprinse între 6.3-8 mAS.

Developarea automată s-a realizat cu ajutorul sistemului digital X-CR Smart Examion, iar imaginile au fost salvate în format DICOM și citite în programul Radiant.

De asemenea, pe parcursul experimentului s-au efectuat recoltări de sânge în vederea monitorizării parametrilor hematologici ai animalelor implicate în experiment cu ajutorul analizorului VET-SCAN HM-5 utilizând kit-uri specifice.

Pentru evidențierea cu mare precizie a proceselor fiziopatologice produse în zona implantului s-a recurs la efectuarea **Tomografia computerizată (CT cu raze X, Siemens Somatom, Balance)**. Imaginile 3D și 2D au fost procesate cu **Software de imagine (versiunea 2.21 Synego viewer)**. Scanarea computer tomografică oferă o mai mare claritate și prezintă detalii în baza cărora se pot identifica afecțiuni la oasele, țesuturilor moi (mușchi, articulații) și a vaselor de sânge din regiunea de implantare, reprezentat de creasta tibială cranială a membrului stâng la oaie. Nu s-au folosit substanțe de contrast pentru evidențierea vascularizației regionale.

Finalul experimentului, prevăzut "ca fiind fără recuperarea animalelor" conform Legii 43/2014, asthef, s-a recurs la eutanasierea animalelor cu T 61 în doză de 3ml/50 kcorp administrat intrapulmonar, utilizându-se 1 flacon pentru toate animalele.

După eutanasiere, s-au recoltat de la locul implantării aliajul implantat și probe din țesuturile peri-implant care au fost procesate prin tehnicile histologice specific.

Tabel cu aliajele implantate:

Nr. aliajului	Tip Aliaj
Aliaj 1.	Ti 15 Mo
Aliaj 2.	Ti 15Mo0,5Si
Aliaj 3.	Ti20Mo0,75 Si
Aliaj 4.	Ti 15 Mo0,75Si
Aliaj 5.	Ti 20Mo
Aliaj 6.	Ti 20Mo0,5 Si
Aliaj 7.	Ti15Mo1,0 Si

La examinarea radiologică se observă procesul de reconstrucție osoasă după efectuarea breșei în tibie.

Computertomografie La lotul martor, în secțiune longitudinală se observă o reacție de osteoliză fiziologică moderată în zona canalului de intrare și deasupra acestuia. În secțiune transversală, reacția de osteoliză este mult mai redusă

În pereții breșei create în creasta tibială se observă izolarea implantului printr-o capsulă conjunctivă groasă, intens vascularizată și bogată în osteoblaste.

În concluzie, implantul **Ti15Mo** nu produce fenomene inflamatorii sau de osteoliză locale, țesutul formează o capsulă groasă în jurul implantului pentru a-l îngloba, în jurul implantului fiind prezente reacții morfo-fiziologice normale de reparare osoasă și osteoliză fiziologică determinată de repararea tisulară și reorganizarea traveelor osoase. La examinarea histologică nu se identifică procese patologice cauzate de prezența implant.

Aliaj 2 **Ti15Mo0,5Si**. Tesut osos cu zone mineralizate care alternează cu altele nemineralizate. În areola osoasă se pot observa celule osteoprogenitoare situate central și osteoblaste atașate de trabecule osoase. La nivelul tibiei nu se observă reacții inflamatorii sau necroze locale generate de implant, acesta este înconjurat de o capsulă conjunctivă de 994.182 μm intens vascularizată, insule de țesut osos nemineralizat se formează în vecinătatea capsulei.

Aliaj 3. **Ti20Mo0,75Si** nu produce procese inflamatorii, necroze sau demineralizări osoase, implantul este delimitat de o capsulă conjunctivă, înspre os se produce regenerarea osoasă normală posttraumatică generată de distrugerile osoase operatorii, aspect surprins și de investigațiile CT.

Aliaj 4. **Ti15Mo0,75Si** Histologic se observă țesut osos imatur continuat cu trabecule osoase parțial mineralizate. În areolele osoase se afla un țesut sarac în celule și fibre de reticulină.

Aliajul 4 nu produce reacție osoasă locală de tipul lizei sau necrozei osoase, este izolat de structurile osoase printr-o capsulă fibroasă bogată în celule osteoprogenitoare, țesut osos imatur care începe să se organizeze sub formă de travee pe direcțiile de forță.

Aliaj 5 **Ti20Mo** Histologic se observă țesut osos nou format și un nucleu cartilaginos. Aliajul 5 nu produce reacție osoasă locală de tipul lizei sau necrozei osoase, este izolat de structurile osoase printr-o capsulă fibroasă bogată în celule osteoprogenitoare, țesut osos imatur care începe să se organizeze sub formă de travee pe direcțiile de forță.

Aliaj 6 **Ti20Mo0,5Si**. Histologic se observă capsula conjunctivă care are un diametru de 396 375-931 734 μm care se continuă cu țesutul osos nou format. Tesutul osos este format din zone mineralizate care alternează cu alele nemineralizate. Tesutul conjunctiv este bogat în celule osteoprogenitoare continuat cu țesut osos nou format.

Aliaj 7 **Ti15Mo1,00Si** se produce deplasarea extrosoasă a implantului, identificarea unei fracturi incomplete pe extremitatea proximală a tibiei, ventral de locul implantării în cea de-a 36-a zi de experiment surprinde implantul ușor deplasat de la locul inițial, deplasarea continuând până la finalizarea experimentului. Nu putem suspecta o reacție de respingere a implantului deoarece reacția locală este moderată fiind determinată de osteoliza fiziologică, calusare și osteogeneză, nu au fost identificate microscopic leziuni de necroză sau osteogeneză anormală.

Ceea ce putem deduce este faptul că aspectul materialului implantat (mărime, formă, grosimea, ascuțimea muchiilor, duritatea și rigiditatea aliajului) raportată la caracteristicile compactei osoase (0,3 cm grosime), solicitarea permanentă a articulației genunchiului și la vârsta animalului au putut determina apariția unei fracturi incomplete care a dus la lărgirea breșei de implantare și la deplasarea implantului. La nivelul țesuturilor moi periosoase nu se înregistrează se procese inflamatorii locale anormale sau de necroză.

Concluzii:

1. Implanturile Ti-Mo și TiMoSi nu cauzează procese degenerative la nivelul compactei și a țesutului spongios, ele sunt delimitate printr-o capsulă conjunctivă de dimensiuni variabile, aspecte evidențiate atât de evaluarea radiologică cât și prin CT, fiind puse în evidență prin examenele histologice.

2. Nu s-au înregistrat creșterea sensibilității locale și regionale postimplant, sau reacții de respingere a implantelor, acestea fiind bine tolerate.

3. Procesul de regenerare tisulară postimplant a urmat aceleași etape, fibros, fibrocartilaginos și început de formare a sistemului osteonal al traveilor osoase în concordanță cu solicitările mecanice generate de forțele care acționează asupra extremității proximale a tibiei (presiune, tracțiune, etc).

4. Evoluția stării generale a animalelor după efectuarea implanturilor a fost monitorizată și prin examene hematologice, rezultatele obținute încadrându-se între limitele normale menționate pentru specia *Ovis aries*.

Testarea biocompatibilității unor aliaje TiMoZrTa și TiMoZrTaSi în diferite concentrații pe speciile de iepure *Lepus europeus* și *Oryctolagus cuniculus*.

Metoda de lucru utilizată privind testarea „in vivo”

Experimentul s-a desfășurat în cadrul Facultății de Medicină Veterinară Iași, constând în testarea biocompatibilității unor aliaje TiMoZrTa și TiMoZrTaSi în diferite procente de concentrație pe speciile de iepure *Lepus europeus* și *Oryctolagus cuniculus*. Pentru a urmări biocompatibilitatea aliajelor propuse în cadrul proiectului cu țesuturile dure ale organismului viu, s-au utilizat un număr de 13 indivizi maturi în vârstă de 8-10 luni, atât masculi cât și femele care au fost împărțiți în două loturi: lotul experimental, la care s-au implantat un număr de 12 aliaje pe bază de TiMoZrTa și TiMoZrTaSi și lotul martor, format dintr-un singur individ la care s-a implantat o tijă metalică ortopedică chirurgicală utilizată frecvent în ortopedie.

Exemplarele au fost cazate în spațiile Spitalizării FMV Iași pe o perioadă de 2,5 luni, perioada derulării experimentului, asigurându-se condițiile de cazare, igienă și alimentație corespunzătoare, conform Directivei EU 60/2010 și a Legii 43/2014 privind protecția animalelor utilizate în scopuri științifice completată de Legea 199/2018, Legea nr. 149/2019 și a Ordinului nr. 94/674/2019. De asemenea, numărul de animale utilizat în experiment respectă principiul reducerii numărului de animale implicate în experiment conform Art 12, alin 2, lit. A din Legea 43/2014.

Pe toată perioada de 60 de zile experimentului, cât și pe perioada de carantină profilactică (14 zile), animalele au fost cazate în cuști individuale cu spațiu suficient pentru a permite mișcarea liberă a acestora, au fost monitorizate din punct de vedere al stării de sănătate și li s-a administrat o dietă corespunzătoare speciei, așa cum prevede legislația națională privind protecția animalelor utilizate în scop experimental.

Metodele de prelevare a probelor biologice au produs un stres minim animalelor conform Art 12, alin 3, lit. b, c, iar procedura de implantare a aliajelor s-a făcut sub anestezie conform Art 13, alin 2. din Legea 43/2014 privind protecția animalelor utilizate în scopuri științifice.

Implantarea aliajelor s-a făcut sub anestezie generală, utilizându-se Xilazină 0,4 ml/kg (1 ml = 20 mg) și Ketamină 0,6 ml/kg (1 ml = 100mg) apoi animalele au fost așezate în decubit dorsal. La locul implantării, pe creasta tibială a membrului pelvin stâng sau drept, s-a efectuat o incizie de aproximativ 0,5 cm iar cu bormașina electrică ortopedică s-a efectuat o breșă în os (canal chirurgical) de aproximativ 0,3 mm diametru și 0,4-0,8 mm adâncime. După introducerea și fixarea implanturilor, periostul și fascia regională au fost suturate în bloc, urmate de sutura pielii. Animalele au fost cazate într-un adăpost igienic și au fost inspectate zilnic în vederea evaluării procesului de cicatrizare. Pentru prevenirea dezvoltării unor procese inflamatorii, fiecărui animal i-a fost administrate antibiotice sub forma produsului Enroxil timp de 5 zile, în doză de 5 mg enrofloxacină/kgcorp/zi, aproximativ 0,5 ml soluție prin injectare subcutanată.

Imediat după intervenție și la sfârșitul experimentului s-au efectuat examene radiologice care au avut ca scop evidențierea poziției implanturilor, a proceselor de regenerare osoasă din jurul implanturilor, precum și surprinderea unor reacții locale posibil generate de interacțiunea chimică dintre implant și țesuturile adiacente.

Radiografiile s-au realizat cu aparatul Intermedical Basic 4006 – acest aparat este mobil și poate executa radiografii în incidențe diverse datorită brațului cu mobilitate mare; inclusiv a tubului

radiogen care se poate fixa în diferite unghiuri și în următoarele incidențe: medio-laterală și cranio-caudală. Pentru această regiune s-au aplicat parametric cu următoarele valori (ușor variabile în funcție de talia animalului și grosimea regiunii de examinat) respectiv tensiune cu valori cuprinse între 48-52 kV și intensitate cu valori cuprinse între 6.3-8 mAS.

Înregistrarea imaginilor s-a realizat cu ajutorul sistemului digital X-CR Smart Examion, iar imaginile au fost salvate în format DICOM și citite în programul Radiant.

De asemenea, pe parcursul experimentului s-au efectuat recoltări de sânge în vederea monitorizării parametrilor hematologici ai animalelor implicate în experiment cu ajutorul analizorului VET-SCAN HM-5 utilizând kit-uri specifice.

La sfârșitul experimentului, s-a efectuat evaluarea CT, utilizând aparatul General Electric LightSpeed 16 cu 16 Slice-uri (16 detectori). Pentru identificarea structurilor periimplant s-a utilizat Scala unității Hounsfield (UH) care este o transformare liniară a măsurării coeficientului liniar de atenuare într-una în care radiodensitatea apei distilate la presiune și temperatură standard (STP) este definită ca unități Hounsfield zero (UH) (de Vos et al, 2009). Conform acestei scale CT, aerul are densitatea minim posibilă, adică minus 1000 UH și apare în culoare neagră la CT, grăsimea în jur de minus 100, iar osul sau calcificările, de peste + 1000 UH. În total, scala Hounsfield are 2000 de unități, de la minus 1000 la plus 1000. Structurile metalice ale implanturilor au densitate mai mare decât structurile biologice și produc artefacte.

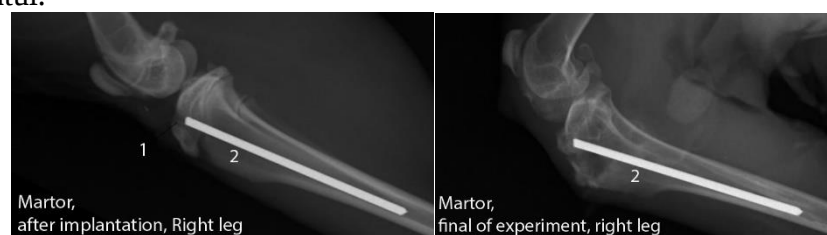
În urma eutanasierii animalelor (conform Art. 22, din Legea 43/2014, Art 5) cu T61 s-au prelevat probe de țesut osos din jurul implantului cât și din limfocentrul popliteu responsabil de drenajul limfatic regional. Finalul experimentului, prevăzut "ca fiind fără recuperarea animalelor" conform Legii 43/2014, astfel, s-a recurs la eutanasierea animalelor cu T 61 în doză de 1ml/individ administrat intrapulmonar, utilizându-se 1 flacon pentru toate animalele.

Acestea au fost prelucrate după tehnici histologice specifice, au fost incluse la parafină, au fost secționate cu microtomul la dimensiunea de 0,2 micrometri și apoi au fost colorate HE, HEA sau prin colorații imunohistochimice speciale.

Rezultate și discuții:

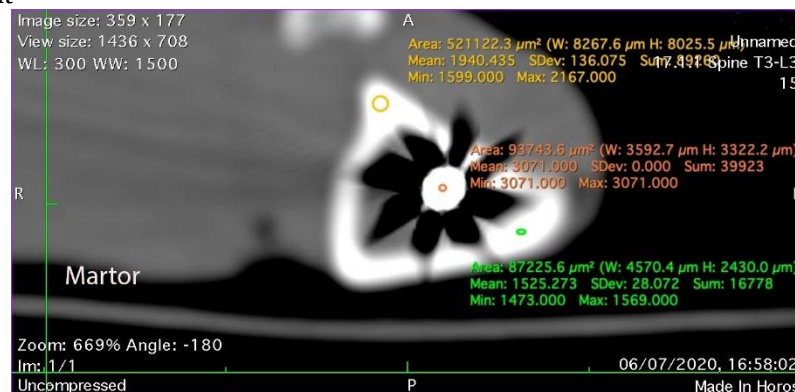
Martor- tija metalica ortopedica inox

Martor: Radiografie membrul pelvin, regiunea articulației femuro-tibio-patelare, incidență latero-laterală dreaptă, implant fără modificări radiologice adiacente. La 60 de zile după implantare, locul breșei de implantare se observă completarea acesteia cu țesut nou format care înglobează implantul.



1- canal chirurgical, 2-

implant



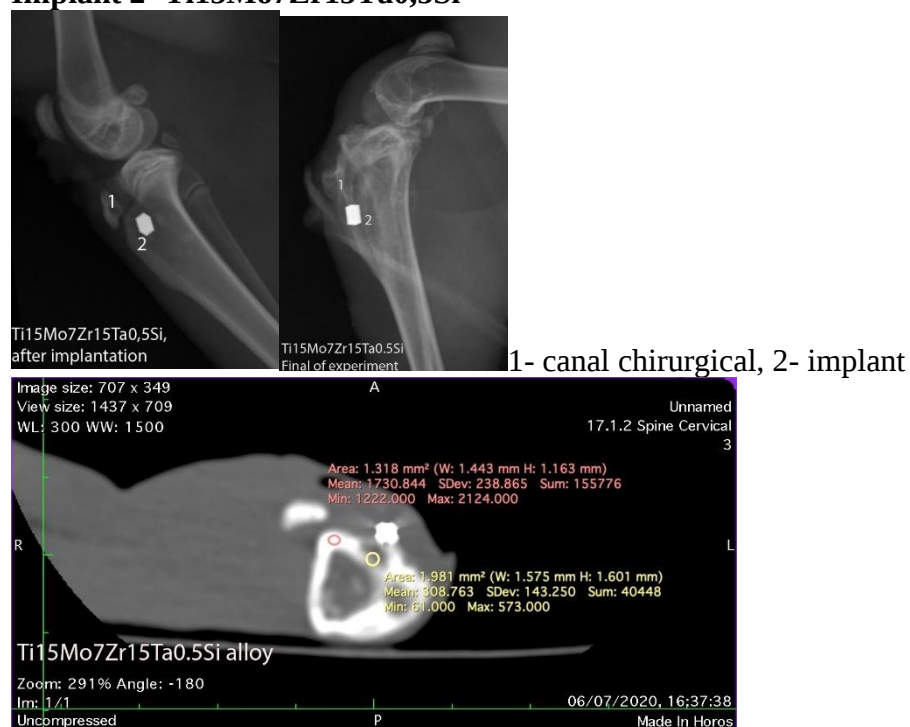
CT. Martor

După 60 zile de la implantare, prin CT se observă poziția tijei ortopedice în canalul medular. Densitatea aliajului tijei ortopedice fiind de aproximativ 3071 UH, a țesutului osos compact între 1599-2167UH (valoarea medie a țesutului osos fiind de aproximativ 1125UH) iar a țesutului fibrocartilaginos ce completează breșa de implant de aproximativ 1473-1569 UH.

Implant 1- Ti15Mo7Zr15Ta

După 60 zile de la implantare, prin CT se observă poziția implantului care este înconjurat de o capsulă fibroasă cu densitatea de până la 698 UH la locul de implantare, densitatea țesutului osos compact între 1359-2127UH.

Implant 2- Ti15Mo7Zr15Ta0,5Si



Radiografie membru pelvin, regiunea articulației femuro-tibio-patelare, incidență latero-laterală dreapta, implant fără modificări radiologice adiacente, stânga, implant fără modificări radiologice adiacente.

După 60 zile de la implantare, prin CT se observă poziția implantului care este înconjurat de o capsulă fibroasă cu densitatea de până la 573 UH la locul de implantare, densitatea țesutului osos compact între 1222-2124UH.

Implant 3- Ti15Mo7Zn15Ta0,75Si

Prin radiografiere se observă regiunea articulației femuro-tibio-patelare, incidență latero-laterală stângă, implant fără modificări radiologice adiacente, dar cu fisuri (intraosoase) în canalul chirurgical, mai jos de implant. La 60 de zile după implantare, canalul chirurgical este completat de țesut osos nou format. La examinare CT se observă că implantul este bine fixat și delimitat, țesutul periimplant nou format are o densitate de aproximativ 755 UH, iar a celui din compacta osoasă de 2079 UH.

Implant 4- Ti15Mo7Zr15Ta1,0Si

Prin X-Ray se evidențiază regiunea articulației femuro-tibio-patelare, incidență latero-laterală stângă, implant fără modificări radiologice adiacente, reacție osoasă în canalul chirurgical, mai jos de implant determinată de traumatismul intraoperator, completată cu țesut nou format după 60 de zile postimplant.

Prin efectuarea CT regionale se constată prezența implantului în canalul medular, breșa de implantare fiind completată de un țesut cu densitatea de aproximativ 633 UH, cea a țesutului osos compact din creasta tibială fiind de aproximativ 1520 UH.

Implant 5- Ti20Mo7Zr15Ta

În imaginile radiologice este surprinsă regiunea articulației femuro-tibio-patelare, incidență latero-laterală stângă, implant plasat în apropierea osului, fără modificări radiologice adiacente.

Prin CT se observă faptul că implantul este înconjurat de o capsulă conjunctivă groasă de aproximativ 2mm cu densitatea cuprinsă între 400-651 UH.

Implant 6- Ti20Mo7Zr15Ta0,5Si

În imaginile radiologice este surprinsă regiunea articulației femuro-tibio-patelare, incidență latero-laterală stângă, implant plasat corect, fără modificări radiologice adiacente.

Prin examinare CT se observă plasarea implantului înspre canalul medular, este înconjurat de o capsulă cu densitatea de cuprinsă între 305-620 UH.

Implant 7- Ti20Mo7Zr15Ta0,75Si

În imaginile radiologice se observă regiunea articulației femuro-tibio-patelare, incidență latero-laterală dreaptă, implant plasat dorsal în creasta tibială, fără modificări radiologice adiacente. La examen CT se observă că implantul este bine fixat în os, este înconjurat de țesut nou format cu densitatea între 300-559 HU.



Implant 8- Ti20Mo7Zr15Ta1,0Si

Radiografie membru pelvin, regiunea articulației femuro-tibio-patelare, incidență latero-laterală dreaptă, implant plasat în canalul de implantare, ușoară reacție locală de osteoliză. La 60 de zile postimplant, canalul de implantare este completat cu țesut nou format, ușor radioopac, fără alte modificări radiologice adiacente;

Prin examen CT se observă că implantul este bine fixat de un țesut nou format cu densitatea între 643-931 UH.

Implant 9- Ti25Mo7Zr15Ta

Radiografie, regiunea articulației femuro-tibio-patelare, incidență latero-laterală stângă, ventral de implant observăm o redusă reacție de radioopacitate. La 60 zile postimplant se observă umplerea canalului de implantare cu țesut nou format, ușor radioopac.

Prin CT se observă că implantul este bine fixat printr-un țesut nou format cu densitate între 94-560 UH

Implant 10- Ti25Mo7Zr15Ta0,5Si

După efectuarea radiografiilor, imediat după și la 60 zile după implantare, în regiunea articulației femuro-tibio-patelare, incidență latero-laterală dreaptă se observă plasarea implantului în canalul chirurgical, care prezintă radioopacitate reidentă în urma distrucției tisulare, fără alte modificări radiologice adiacente. La 60 de zile postimplant, implantul își păstrează poziția, canalul de implantare și periimplant se observă formarea unui țesut nou ce manifestă ușoară radioopacitate.

Prin examinare CT se observă că implantul este plasat în canalul medular foarte aproape de breșa de implantare (1.003mm), țesutul nou format având o densitate între 696-866 UH.

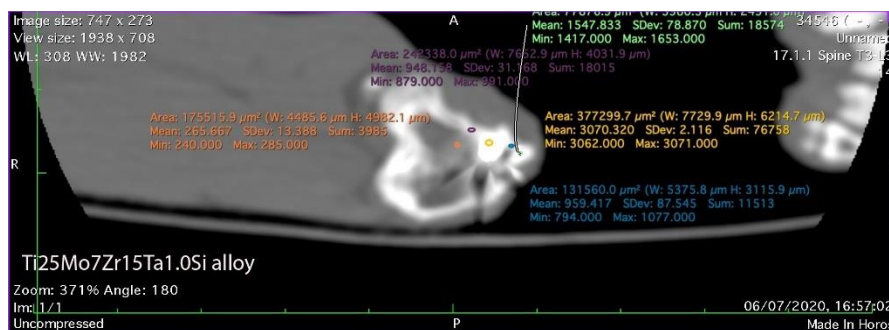
Implant 11- Ti25Mo7Zr15Ta0,75Si. Radiografierea regiunii articulației femuro-tibio-patelare, incidență latero-laterală stângă: implant plasat în canalul chirurgical, radioopacitate pronunțată a canalului de implantare. După 60 de zile postimplant, canalul chirurgical și spațiul periimplant sunt completate de țesut nou format, cu radioopacitate redusă, fără modificări radiologice adiacente.

Prin examen CT se evidentiază că implantul este bine fixat, țesutul nou format din jurul implantului având densitatea de până la 664 UH.



Implant 12- Ti25Mo7Zr15Ta1,0Si

După radiografierea ulterioară implantării în regiunea articulației femuro-tibio-patelare, incidență latero-laterală dreaptă, se observă că implantul este prezent în canalul de implantare, fără modificări radiologice adiacente. După 60 zile postimplant, radioopacitatea periimplant este mai puțin evidentă fără modificări radiologice adiacente. Prin examen CT se evidentiază că implantul este bine fixat, tesutul nou format din jurul implantului având densitatea de până la 794-991 UH.



Analiza histologică a biocompatibilității implanturilor studiate

Prin metode histologice specifice fost evaluat procesul de vindecare osoasă/răspunsul celular osos și performanța materialului implantat prin intermediul detaliilor histologice. Analiza histologică a început cu fazele vindecării (60 zile) post-implantare și a pus accent pe evidențierea morfologiei zonei osoase peri-implantare. Astfel s-au luat în considerare aspecte ale osteointegrării precum proliferarea celulară, diferențierea și clasificarea tipului de celulă, neoangiogeneza, procesul de vindecare și remodelare osoasă.

La lotul martor, zona periferică se caracterizează printr-un periost îngrosat cu celulele stem mezenchimale care se vor diferenția în osteoblaste, implicate în sinteza preoseinei și a fibrelor de collagen (fig1a). Preoseina se mineralizează prin activitatea osteoblastelor și se formează osea care structurează traveele osoase. Oseina mineralizată delimitează lacune care adăpostesc osteocite mari, active, implicate în metabolismul osului (fig. 1b).

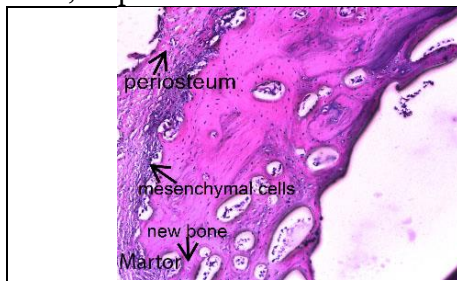


Fig.1a. Implant in tibie la iepurele martor. Periostul prezintă în zona internă celule mezenchimale care se

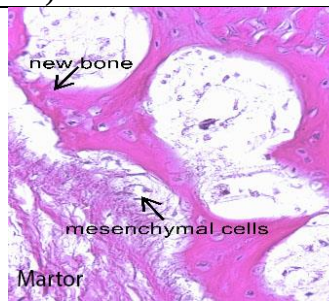


Fig1b. Zonă intensă de regenerare osoasă. Se poate observa densitatea celulară mare de celule mezenchimale și

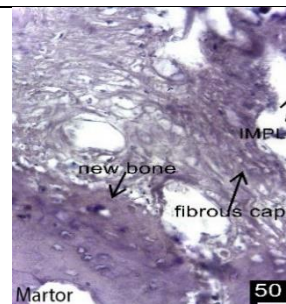
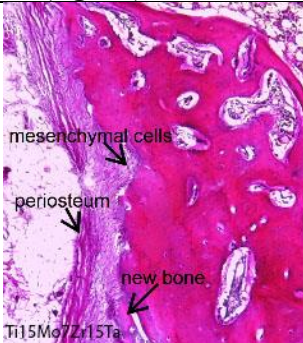
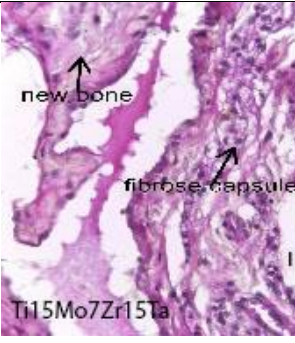


Fig. 1c. Capsula fibroasă densă care se continua cu tesut osos nou format peri-implant; celule

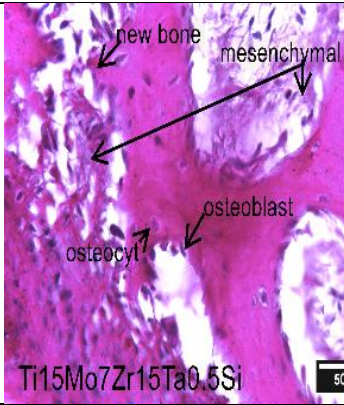
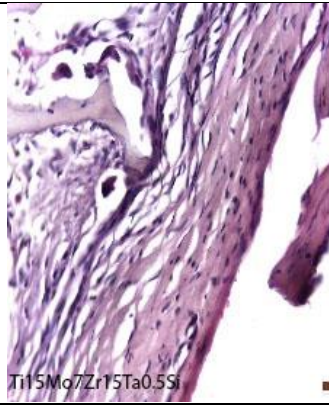
diferențiază în osteoblaste active. În vecinătatea acestei zone se observă țesut osos nou trabecular și compact. Col Hex100	osteoblastice dispersată printre fibre de collagen nou sintetizate; osteoid nou sintetizat cu un gradient ușor de mineralizare); osteocite captive în lacune osoase ce continuă metabolismul osos. Col HEx400	stem mezenchimale se diferențiază în osteoblaste care ulterior devin osteocite, plasate în lacunele osoase. Col HEx400
--	---	--

Osteoblastele sunt celule active, cu rol în sinteza preoseinei, cu aspect prismatic așezate pe traveea osoasă. În vecinătatea implantului s-a observat o capsulă densă fibroasă care se continuă cu țesut osos nou format, aflat în remodelare zonal despartite de linii de ciment (fig 1c).

În cazul aliajului **Ti15Mo7Zr15Ta**, la locul implantării și periimplant se observă un strat mai consistent de celule stem mezenchimale (fig2a) care se continuă cu osteoblaste implicate în sinteza țesutului osos (fig 2b). Capsula fibroasă din jurul implantului se continuă cu țesut osos nou format de tip spongios (fig. 2c).

		
Fig. 2a Implant în tibie la iepure. Periost cu aspect normal, prezintă în zona internă a acestuia celule mezenchimale care se diferențiază în osteoblaste active. În vecinătatea acestei zone se observă țesut osos nou, trabecular și compact. Col HEx	Fig.2b Centru de osificare intramembranoasă, mezenchim condensat bogat în celule osteoprogenitoare; zone de țesut osos imatur bogat în osteocite (roz slab intens) și numeroase zone de țesut matur mărginit de osteoblaste numeroase ce își continuă activitatea secretorie.Col HEx100	Fig. 2c Zona peri-implantară; centru de osificare intramembranoasă cu numeroase celule stem mezenchimale proliferate care se regăsesc și în areole osoase diferențiate în osteoblaste. Col HEx400

Capsula conjunctivă din jurul implantului **Ti15Mo7Zr15Ta0.5Si** prezintă în zona internă celule mezenchimale care se regăsesc în areolele osoase (fig.3a). Țesutul osos nou format conține un număr mic de lamele osoase, în trevile osoase se pot observa zone de remodelare osoasă (fig.3b). În zona peri-implantară se diferențiază centre de osificare intramembranoasă cu numeroase celule stem mezenchimale proliferate care se regăsesc și în areole osoase diferențiate osteoblastic (fig 3c)

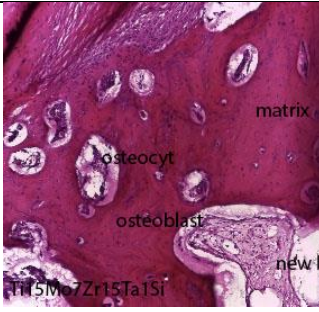
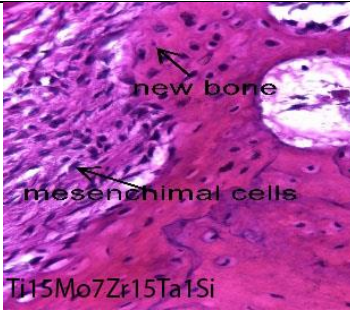
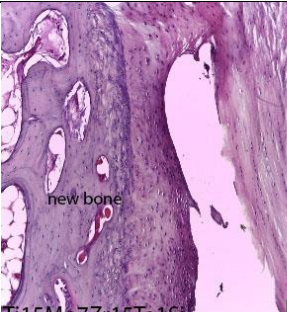
		
Fig. 3a Periost, în zona internă se continuă cu celule mezenchimale care se regăsesc în areolele osoase. Țesutul osos nou format este constituit dintr-un număr mic de lamele osoase, în trevi se pot observa zone de remodelare osoasă. Col HEx 200	Fig. 3b. Osificare intramembranoasă ce inițiază procesul de osificare prin diferențierea celulelor mezenchimale în celule osteoprogenitoare; celulele osteoprogenitoare se transformă în osteoblaste care secretă în mod special collagen 1, sialoproteine, osteoclastina și osteoid. Col Hex400	Fig 3c Zona peri-implantară; centru de osificare intramembranoasă cu numeroase celule stem mezenchimale proliferate care se regăsesc și în areole osoase diferențiate osteoblastic. Col HEx400

În cazul aliajului **Ti15Mo7Zr15Ta0.75Si** din periost se desprind celule mezenchimale care se diferențiază în osteoblaste (fig. 4a). În vecinătatea periostului se evidențiază canale Havers cu un număr mic de lamele și zone de remodelare osoasă în travee (fig. 4b). Zona peri-implant prezintă centre de osificare intramembranoasă cu formarea lamelor osoase cu numeroase celule stem mezenchimale în areole (fig. 4c)

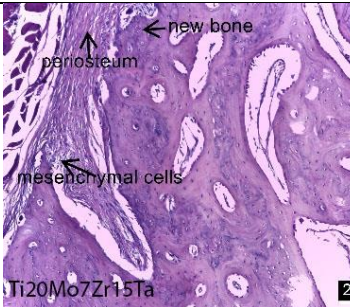
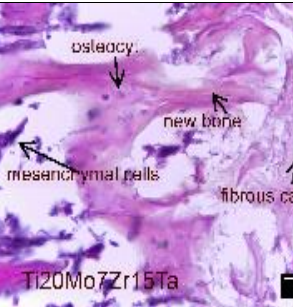
		
Fig. 4a Periost din care se desprind celule mezenchimale care se diferențiază în osteoblaste. În vecinătatea periostului se evidențiază canale Havers cu un număr mic de lamele și zone de remodelare osoasă în travee. Col Hex200	Fig. 4b Travee osoase. Populație de celule mezenchimale diferențiate osteogenic și nediferențiate încă (celulele cu formă filiformă) înconjurate de o matrice de collagen dispusă haotic; zonă de țesut osos imatur cu densitate celulară mare, cu osteocite active care mineralizează osteoidul depus, captive în lacune, și osteoblaste mezenchimale dispuse la suprafața acestuia,	Fig. 4c Zona peri-implantară; centru de osificare intramembranoasă cu formarea lamelor osoase cu numeroase celule stem mezenchimale. Col HEx400

	unele în curs de transformare în osteocite (mărginite parțial de osteoid) Col Hex400	
--	--	--

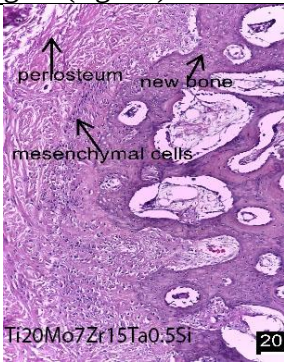
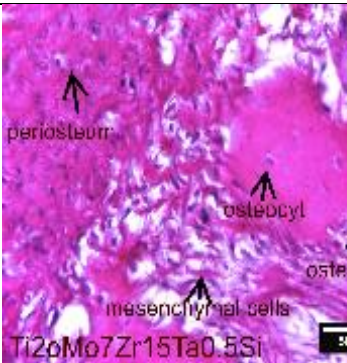
În cazul aliajului **Ti15Mo7Zr15Ta1Si**, în zona periimplant au fost surprinse zone de osificare intramembranoasă cât și endocondrală. În zona de regenerare osoasă periferică a fost surprins un strat de celule mezenchimale care se continuă cu țesut osos imatur cu densitate celulară mare (fig 5a), osteoblaste active, linie de mineralizare și țesut osos matur cu densitate celulară mai mică (fig. 5b), matrice mineralizată și osteocite plasate în lacune osoase. Osteoblastele sunt dispuse liniar la periferia țesutului lamelar. Zona peri-implant prezintă modelul de regenerare (vindecare) indirectă și constă într-o zonă de osificare endocondrală și una intramembranoasă, țesutul osos nou format fiind intens vascularizat (fig. 5c) Prezența osului lamelar compact și osteocitelor mature în apropierea suprafeței implantului indică o bună biocompatibilitate și în mod cert, prezența implantului nu a interferat cu procesele normale de formare osoasă.

		
Fig. 5a Zonă de regenerare osoasă. Țesut osos imatur, cu densitate celulară mare unde sunt prezente osteoblaste active; Țesut osos matur cu matrice mineralizată; osteocite în lacune osoase; osteoblaste dispuse liniar la periferia țesutului lamelar format din țesut conjunctiv. Col Hex100	Fig. 5b Centru de osificare intramembranoasă: densitate mare de celule mezenchimale diferențiate osteogenic printre care osteoblaste active; travee de țesut osos nou format cu linii de mineralizare și osteocite în număr mare, Col HEx100.	Fig 5c Zona peri-implant cu vindecare indirectă: o zonă de osificare endocondrală și intramembranoasă. Țesutul osos nou format intens vascularizat. Col HE x200

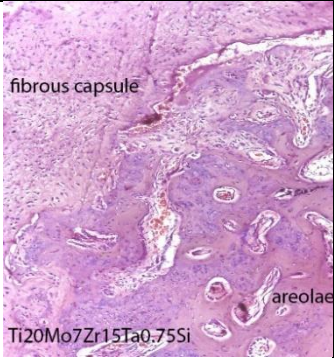
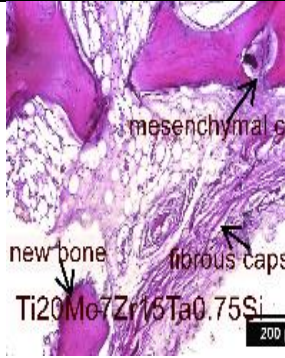
În cazul implantului cu aliajul **Ti20Mo7Zr15Ta**, la nivelul tibiei, zona periferică se caracterizează printr-un periost îngrosat cu celulele stem mezenchimale care se vor diferenția în osteoblaste, altele se deplasează în areolele țesutului osos nou format și din vecinătatea periostului (fig.6a). Preoseina se mineralizează prin activitatea osteoblastelor și osteocitelor se formează oseina care structurează traveele osoase. În oseina mineralizată se delimitează lacune care adăpostesc osteocite mari, active, implicate în metabolismul osului (fig. 6b). În această zonă alternează insule de os mineralizat și nemineralizat și rare linii de mineralizare. În vecinătatea implantului s-a observat o capsulă densă fibroasă care se continuă cu țesut osos nou format, aflat în remodelare, zonal despărțite de linii de ciment (fig 6c).

		
Fig. 6a În zona periostului se disting celule mezenchimale continuate în spațiul intertrabecular și osteoblaste differentiate așezate epiteliiform pe traveele osoase nou formate. Col HE x400	Fig. 6b Un detaliu al zonei periostului și țesut osos compact nou format cu zone de remodelare. Col HE x100	Fig 6c Zona din vecinătatea implantului este formată dintr-o capsulă fibroasă subțire continuată cu țesut osos trabecular cu semne de remodelare osoasă. Col. HEx 400

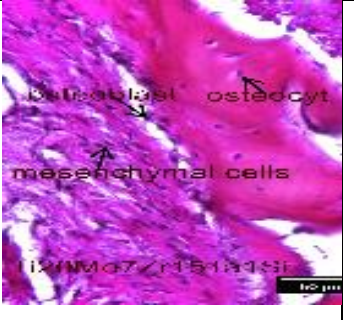
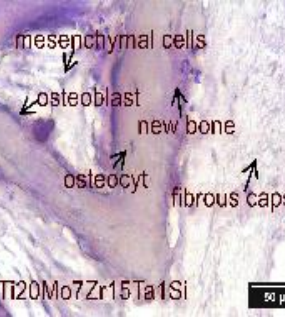
În cazul implantului cu aliajul **Ti20Mo7Zr15Ta0.5Si**, în zona periimplant este surprinsă activarea periostului (fig7a), celule mezenchimale sunt activate și se diferențiază în osteoblaste cu rol în sinteza a oseinei, după maturare ele se transformă în osteocite (fig 7b). În vecinătatea periostului se evidențiază țesut osos nou format. În zona din vecinătatea implantului au fost observate travei osoase subțiri și un număr mare de celule mezenchimale stem. Traveele mai groase sunt formate din țesut osos spongios (fig. 7c).

		
Fig. 7a Periostul se continuă în zona internă cu celule mezenchimale care se diferențiază în osteoblaste care sintetizează noul os. Col HE x400	Fig. 7b Celule mezenchimale diferențiate în osteoblaste care sintetizează noul os. Col HE x400.	Fig 7c. În zona din vecinătatea implantului au fost observate travei osoase subțiri și un număr mare de celule mezenchimale stem. Traveele mai groase sunt produse de țesutul osos spongios. Col HE x400

În cazul aliajului **Ti20Mo7Zr0.75Si**, zona periferică din jurul implantului se caracterizează printr-un periost cu celulele stem mezenchimale activate care se vor diferenția în osteoblaste, implicate în sinteza preoseinei și a fibrelor de collagen (fig.8a). Preoseina se mineralizează prin activitatea osteoblastelor și se formează oseina care structurează traveele osoase și osteoanele. Oseina mineralizată delimitează lacune în care se pot observa osteocite mari ce sunt implicate în metabolismul osului. În areole se găsesc celule stem mezenchimale și osteoblaste (fig. 8b). Osteoblastele au rol în sinteza preoseinei, ele apar prismatice fiind așezate pe 1-2 rânduri pe traveea osoasă. În zona din vecinătatea implantului au fost observate travei osoase mai îngroșate și un număr mare de celule mezenchimale stem (fig. 8c).

		
Fig. 8a Țesut osos din vecinătatea periostului și a implantului. În secțiune apare o parte din capsula conjunctivă formată din celule stem mezenchimale dense plasate în areole. Atașate de traveele osoase apar osteoblastele dispuse pe un rand. În areolele de dimensiuni diferite apar insule de celule stem mezenchimale. Col HE x400	Fig. 8b Celule mezenchimale diferențiate în osteoblaste care sintetizează noul os prin osificare desmală. Col HE x400.	Fig. 8c. Zona periimplant formată dintr-o capsulă fibroasă care se continuă cu țesut osos nou format cu aspect lamelar unde sunt prezente osteoblaste dispuse spre periferie. Col HE x400

În cazul aliajului **Ti20Mo7Zr15Ta1Si** la locul implantării periostul prezintă un strat mai gros de celule mezenchimale (fig 9a). Celulele proliferate se continuă în areolele osoase din vecinătatea periostului, altele sunt diferențiate în osteoblaste, fiind așezate pe 1-2 randuri sub forma unor travee osoase cu activitate de sinteza a componentelor osului (fig 9b). Zona periimplant este formată dintr-o capsulă fibroasă care se continuă cu țesut osos nou format ce are aspect trabecular, fiind bogat în osteoblaste dispuse la periferie. Osteocitele sunt mari și active metabolic (fig. 9c).

		
Fig. 9a Periostul, cu aspect normal, se continuă în zona internă cu celule mezenchimale care se diferențiază în osteoblaste ce sintetizează noul os. Col HE x40	Fig. 9b Țesut osos subperiostal din zona periimplantului. Celule mezenchimale diferențiate în osteoblaste care sintetizează osul nou. Col HE x400.	Fig. 9c Zona periimplant formată dintr-o capsulă fibroasă care se continuă cu țesut osos nou format cu aspect trabecular, cu osteoblaste dispuse la periferie. Col HE x400

Concluzii:

1. Aliajele au o bună compatibilitate cu țesutul osos, atât prin tehnica radiografierii cât și prin examinare CT nu se observă reacții sau modificări anormale ale țesuturilor adiacente implantului

2. Prin examinare CT s-a evidențiat faptul că implanturile sunt înconjurate de țesut cu densitate de aproximativ 500-1070 UH, specifică pentru țesuturile fibro-cartilaginoase.

3. Prin examen CT s-a măsurat densitatea implanturilor, fiind de aproximativ 3062-3071 UH

4. În cazul grupului de aliaje Ti15Mo7Zr15Ta, Ti15Mo7Zr15Ta0.5Si, Ti15Mo7Zr15Ta0.75Si, Ti15Mo7Zr15Ta1, prezența țesutului osos lamelar a compactei osoase și a osteocitelor mature în apropierea suprafeței implantului indică o bună biocompatibilitate și aderarea de țesutul învecinat și, în mod cert, prezența aliajelor nu a interferat cu procesele normale de regenerare osoasă periimplant.

5. În cazul grupului de aliaje Ti20Mo7Zr15Ta, Ti20Mo7, Zr15Ta0.5Si, Ti20Mo7Zr15Ta0.75Si, Ti20Mo7Zr15Ta1.0Si s-a observat o fortificare histologică activă a țesutului osos peri-implantar aspect corespunzător unei bune osteointegrări.

6. După 60 zile de la implantare, atât în cazul martorului cât și la indivizii implantați cu aliajele amintite anterior, prezența structurilor lamelare ale compactei osoase și a osteocitelor mature în apropierea suprafeței implantului indică o bună biocompatibilitate a aliajelor analizate și în mod cert, prezența implantului nu a interferat cu procesele normale de remodelare osoasă.

Proiect 3. **Dezvoltarea unor noi aliaje dentare cu ruteniu**, (Acronim BIODENTRUT),
Responsabil Șef lucr. Dr. BURTAN Liviu

Testarea materialelor se va face pe un model animal cât mai apropiat de om, care să reproducă fidel aspectele patologiei.

Utilizarea și alegerea modelului animal în cercetarea medicală și, mai ales, în studiul biomaterialelor cu rol regenerativ, este o etapă extrem de importantă, întrucât experimentul trebuie să respecte regula celor "3 R" (**R**eplacement, **R**eduction, **R**efinement) (W. M. S. Russell and R. L. Burch in 1959) și în plus translaționarea rezultatelor de la animalul de experiență la om trebuie să fie posibilă.

Materialul/ materialele luate în studiu vor fi pe rând testate "in vitro" "in vivo" și "in situ".

Testarea "in vitro" va urmări efectul biomaterialelor asupra culturilor celulare, eventualele efecte citopatice și citotoxice ce pot apărea.

Testarea "in vivo" va două direcții principale: biocompatibilitate tisulară și reacția țesuturilor.

Pentru a urmări reacția de a biomaterialelor propuse (?) până la testarea "in situ", acestea vor fi testate "in vivo", prin implantare la animalele de experiență în țesutul conjunctiv subcutanat.

Reacția tisulară va fi urmărită prin examene histopatologice utilizând colorații uzuale la intervale de 24h, 48 h și 7, 14 și 30 zile de la implantare. Gradul de resorbție al materialului se va aprecia prin morfometrie.

Rezultatele testării "in situ" se vor obține prin coroborarea datelor obținute la examenul imagistic (radiologic, computer-tomografie, microCT) cu datele examenului histopatologic și imunohistochimic din regiunile implantate cu material.

Pentru a putea evalua din punct de vedere histopatologic reacția tisulară la toate animalele din lot care au fost supuse experimentării chirurgicale, acestea vor fi eutanasiate treptat după un protocol bine stabilit, astfel ca de la început și până la final să putem evalua gradul de biocompatibilitate.

Se va urmări eventuala reacție inflamatorie, evaluare cantitativă și calitativă.

Prin imunohistochimie se vor evidenția markeri de proliferare celulară (ki-67, PCNA – Proliferating Cell Nuclear Antigen), prezența lor confirmând proliferarea celulară locală, cât și identificarea unor constituenți ai matricei extracelulare.

Noi ne propunem testarea materialelor pe o perioadă mult mai îndelungată (24 luni), pentru a observa efectele lui terapeutice.

Biocompatibilitatea in vivo a aliajelor dentare si a protezelor dentare metalo-ceramice

Implanturile orale sunt considerate dispozitive protetice de mare succes. Ele înlocuiesc cu succes funcția dinților și restaurează estetica și fac acest lucru cu o rată de eșec / complicație remarcabil de mică. Având în vedere aceste caracteristici atrăgătoare, este de înțeles că, în ultimul deceniu, cererea de implanturi orale a crescut drastic. Cu această creștere precipitantă a apărut o gamă uluitoare de modificări ale implantului, toate concepute pentru a îmbunătăți procesul de osseointegrare. Aceste modificări includ ajustări în timpul încărcării, variații ale caracteristicilor de suprafață, modificări ale formei implantului și adăugarea factorilor de creștere sau a altor stimuli biologici destinați "activării" suprafeței implantului. Cu toate acestea, măsura în care majoritatea acestor modificări îmbunătățește osseointegrarea implantului nu este cunoscută.

În consecință, este oarecum o surpriză că marea majoritatea studiilor experimentale privind osseointegrarea orală a implantului se realizează în oase lungi, mai degrabă decât pe maxilar sau mandibulă. Cele mai frecvent citate motive pentru efectuarea analizelor implanturilor orale în oase lungi sunt dimensiunea lor relativă și accesibilitatea ușoară (Popelut et al., 2010; Yan et al., 2011; Sennerby et al., 1993).

Oasele lungi conțin, de asemenea, o cavitate mare foarte pro-osteogenă, care facilitează formarea rapidă a osului în jurul unui implant (de Barros et al., 2010; Leucht et al., 2007). Mai mult, studiile efectuate pe șoareci demonstrează că spațiul măduvei este în primul rând responsabil pentru generarea acestui nou os de periimplant (Popelut et al., 2010; Leucht et al., 2007; Colnot et al., 2007).

Folosirea câinilor pentru osteointegrarea implantului oral prezintă un avantaj semnificativ deoarece implanturile de dimensiuni umane pot fi testate direct pe câine. Cu toate acestea, există o serie de limitări grave, inclusiv costul asociat unui studiu amplu cu canini și lipsa completă de informații genetice, moleculare și celulare pentru analize.

Metalele prețioase au o lungă istorie de utilizare pentru aplicațiile dentare, datorită ușurinței lor de manipulare și a unei biocompatibilități excelente. În prezent, cele mai prețioase aliaje sunt folosite pentru restaurarea dinților.

Elementele platinice (platina, iridiu, paladiu, rodiu și ruteniu), ca și sarurile lor, prezintă slabe efecte de intoxicare pentru organismul uman, inclusiv dacă sunt prezente în cavitatea bucală, motiv pentru care sunt pe larg utilizate în aliajele dentare.

Ruthenium este rar menționat în cercetarile microbiologice, datorită faptului că acest metal nu are roluri esențiale cunoscute în sistemele biologice și nici nu este în general considerat toxic. Complexele de ruteniu au fost investigate ca agenți potențiali antimicrobieni, antiparazitici și chimioterapeutici dar și ca inhibitori ai canalelor de calciu. Complexele de ruteniu sunt, de asemenea, utilizate ca agenți antimicrobieni și alternative sau adjuvanți la antibiotice mai tradiționale. Astfel de contribuții noi din chimia organometalică sunt, fără îndoială, extrem de necesare pentru a aborda criza de rezistență antimicrobiană și apariția lentă pe piață a noilor antibiotice (Southam et al., 2017)

Experimentele *in vivo* au demonstrat că un complex de ruteniu (II) [Ru (dmp) 2 (ipad)] (ClO₄) 2 a inhibat dependența de doză a unei linii celulare de carcinom de ficat uman (BEL-7402) care a fost xenotransplantată la șoarecii nuzi. Analizele au arătat că acest complex a indus apoptoza în celulele țesutului tumoral dar cu efecte toxice asupra celulelor rinichilor, sângelui și măduvei osoase la șoarecii tratați. O examinare toxicologică a indicat faptul că doze mari de Ru pot provoca leziuni renale și pot duce la creșteri ale creatininei serice. În plus, Ru părea a fi genotoxic și toxic hematologic într-o manieră dependentă de doză. Rezultatele obținute au furnizat informații de bază referitoare la proiectarea ulterioară a medicamentelor antitumorale de ruthenium (II) (Wang et al., 2018).

Potențialul anticancer al complexelor de ruteniu a fost investigat pe scară largă, însă studiile de evaluare a siguranței sunt încă puține. În ciuda agenților antineoplazici pe bază de ruthenium, se știe că provoacă mai puține efecte secundare comparativ cu alte medicamente pe bază de metale, acești compuși nu sunt complet lipsiți de toxicitate, cauzând în principal nefrotoxicitate. Pe baza rezultatelor promițătoare ale activității antitumorale a complexelor [Ru (L-Met) (bipy) (dppb)] PF₆ (RuMet) și [Ru

(Lpp)] PF6 (RuTrp) prima dată am investigat profilul de toxicitate al acestor complexe la rozătoare și peștii zebură. Toxicitatea orală acută a fost evaluată la șoareci elvețieni. Potențialul mutagen și genotoxic a fost determinat printr-o combinație de protocoale Micronucleus (MN) și Comet, după expunerea șoarecilor elvețieni la RuMet și RuTrp în doze terapeutice. Au fost expuse la aceste complexe embrionii din zebrafish, iar dezvoltarea acestora a fost observată până la 96 ore după fertilizare. Complexele RuMet și RuTrp au prezentat o toxicitate acută orală redusă. Modificările comportamentale înregistrate nu au fost înregistrate, nici modificări morfologice macroscopice sau modificări structurale în ficat și rinichi. Aceste complexe nu au provocat toxicitate genetică, prezentând o lipsă de formare a micronucleilor și o inducție redusă a deteriorării ADN în celulele de la șoareci elvețieni. În contradicție, tratamentul cu cisplatină a prezentat o mutagenitate și o genotoxicitate ridicată. RuMet și RuTrp au prezentat o toxicitate scăzută în dezvoltarea embrionului de zebură. Complexele RuMet și RuTrp au demonstrat o toxicitate scăzută în cele două modele de studiu, o proprietate interesantă în studiile preclinice pentru medicamentele anticanceroase noi (Mello-Andrade et al., 2018).

Recent, s-a constatat că o serie de complexe de ruteniu tiazolo-arenă cu o intensitate citotoxică *in vitro*, atât pe celulele cancerigene ovariene care sunt sensibile la cisplatină, cât și pe cea a cisplatinei.

Complexul de ruteniu a fost administrat pe șobolani femele Cr1: WI pe cale orală, prin intubare gastrică și injectare intraperitoneală. Parametrii hematologici și modificările histopatologice ale ficatului, rinichilor, splinei și creierului au fost investigate după un tratament de 14 zile. Substanța a fost bine tolerată pe cale orală, cu o valoare LD50 de peste 2000 mg / kg greutate corporală.

Simptomele au fost observate numai în prima zi după administrarea intraperitoneală a celei mai mari doze, cu o valoare LD50 între 300 și 2000 mg / kg corp. Profilul hematologic nu a fost modificat la niciuna dintre dozele testate, după administrarea acută orală și intraperitoneală. Modificările structurale (limfocitoliză moderată) au fost identificate numai în splina la cea mai mare doză testată. În concluzie, complexul de tiazolo arenă de ruteniu a fost foarte bine tolerat oral și a avut o toxicitate acută scăzută după administrarea intraperitoneală la șobolani Cr1: WI (Grozav et al., 2016).

Studiile de bază din științele fizice și biologice au susținut dezvoltarea sistemelor de implant chirurgical. Un exemplu este progresul continuu de la materialele care au fost disponibile pentru aplicații industriale la noile clase de compozite care au evoluat pentru aplicații biomedicale. Aceeași situație există într-o arie largă (de exemplu, știința și tehnologia de suprafață, mecanica și biomecanica structurilor tridimensionale, căile și procesele de vindecare a rănilor de-a lungul interfețelor biomateriale și descrierea primelor biofilme care evoluează la contactul cu sângele sau țesutul fluide). Trecerea progresivă de la materiale la biomateriale caracterizate cantitativ a fost extrem de importantă pentru aplicațiile biomedicale ale implanturilor chirurgicale. Investigațiile privind implanturile dentare joacă acum un rol de lider în anumite domenii ale acestui proces general și toate fazele medicinei și stomatologiei ar trebui să beneficieze.

Profilele de biocompatibilitate ale substanțelor sintetice (biomateriale) utilizate pentru înlocuirea sau mărirea țesuturilor biologice au fost întotdeauna o preocupare în cadrul disciplinelor medicale. Circumstanțele speciale sunt asociate cu reconstrucția protetică a implantului dentar a zonelor oral-maxilo-faciale, deoarece dispozitivele se extind din gură, peste zonele epiteliale de protecție și pe sau în osul subiacent.

Aspectele funcționale de utilizare includ, de asemenea, transferul de forță de pe suprafețele ocluzale ale dinților prin coroană, punte și regiunea conectorului gâtului implantului în implant pentru transferul interfațial către țesuturile moi și dure de susținere. Această situație reprezintă o serie foarte complexă de condiții de mediu chimice și mecanice.

Cel mai critic aspect al biocompatibilității depinde, desigur, de volumul de bază și de proprietățile de suprafață ale biomaterialului. Toate aspectele privind fabricația de bază, finisarea, ambalarea și livrarea, sterilizarea și plasarea (inclusiv plasarea chirurgicală) trebuie să fie controlate în mod adecvat pentru a asigura condiții curate și nontraumatizante. Importanța acestor considerente a

fost re-evidențiată prin conceptul și practica osseointegrării sistemelor de implanturi de rădăcină endosteală.

Proprietățile fizice, mecanice, chimice și electrice ale componentelor materialului de bază trebuie să fie întotdeauna evaluate integral pentru orice aplicație biomaterială, deoarece aceste proprietăți furnizează contribuții cheie în analizele biomecanice și biologice corelate ale funcției. O proprietate importantă a materialului legată de proiectarea (forma și optimizarea) este plasticitate (o componentă a modulului elastic) a materialului.

Coroziunea este o preocupare specială pentru materialele metalice din implantologia dentară, deoarece implanturile ies în cavitatea bucală, unde electroliții și compozițiile de oxigen diferă de cele ale fluidelor tisulare. În plus, pH-ul poate varia semnificativ în zone sub placă și în cavitatea bucală. Acest lucru crește intervalul de pH la care sunt expuse implanturile în cavitatea bucală, comparativ cu situsurile specifice din țesut. Plenk și Zitter afirmă că coroziunea galvanică (GC) ar putea fi mai mare pentru implanturile dentare decât pentru implanturile ortopedice. Procesele galvanice depind de pasivitatea straturilor de oxid, care se caracterizează printr-o rată de dizolvare minimă și o putere mare de regenerare pentru metale precum titanul. Stratul pasiv are doar câțiva nanometri gros și de obicei compus din oxizi sau hidroxizi ai elementelor metalice care au cea mai mare afinitate pentru oxigen. În metalele cu grup reactiv, cum ar fi titanul, niobiul, zirconiu, tantalul și aliajele conexe, materialele de bază determină proprietățile stratului pasiv. Zonele de stabilitate ale oxizilor elementelor pasive acoperă potențialele redox și valorile de pH tipice mediului oral. Cu toate acestea, oxizii de titan, tantal și niobiu acoperă o zonă semnificativ mai mare de stabilitate a mediului în comparație cu oxizii de crom.

A fost considerat anterior riscul degradării mecanice, cum ar fi zgârierea sau frezarea materialelor implantate, combinate cu coroziunea și eliberarea în oase și organe îndepărtate. De exemplu, investigatorii precum Laing și Lemons au studiat pe larg coroziunea implanturilor metalice. Steinemann și colab. au prezentat multe dintre relațiile de bază specifice coroziunii implantului. Mears a abordat îngrijorările cu privire la GC și a studiat răspunsul local al țesuturilor la oțel inoxidabil și cobalt-crom-molibden (Co-Cr-Mo) și a arătat eliberarea de ioni metalici în țesuturi. Williams a sugerat că trei tipuri de coroziune au fost cele mai relevante pentru implanturile dentare: (1) fisurarea coroziunii la stres (SCC), (2) GC și (3) coroziunea fretting (FC).

Unul dintre numeroasele avantaje ale aliajelor metalice este faptul că acestea sunt puternice și sunt capabile să reziste forțelor în timpul funcției fără deformare permanentă. Acest lucru permite restaurările să fie construite în secțiuni subțiri, ceea ce în gură este avantajos, deoarece țesutul dinților poate fi conservat printr-o pregătire minimă a dinților.

- Rezistența la forță este forța pe unitatea de suprafață (tensiune) necesară pentru deformarea permanentă a aliajului. Depășirea puterii de randament este clar nedorită pentru aplicații dentare. Rezistența randamentului este așadar o proprietate utilizată pentru a descrie comportamentul unui aliaj. Se măsoară în mega pascali.

- Punctul de randament este definit ca tensiunea la care un material începe să se deformeze plastic. Înainte de punctul de producție, materialul se va deforma elastic revenind la forma sa inițială atunci când stresul este îndepărtat. Odată ce punctul de randament este trecut, o proporție a deformării va fi permanentă și ireversibilă.

- Legătura cu puterea de randament este duritatea care crește odată cu creșterea rezistenței. Acest lucru oferă dentistului și tehnicianului dentar o indicație a dificultății de a macina și lustrui un aliaj. Unele aliaje metalice pot fi tratate termic pentru a le crește duritatea.

- Ductilitatea este capacitatea unui aliaj de a se deforma sub tensiune. Acest lucru este important atunci când agrafele trebuie să fie îndoite și incrustările arzate pentru a le îmbunătăți adaptarea și marginea. Rigiditatea aliajului este determinată de modulul său elastic și de designul turnării.

Prin urmare, dorința de a influența pozitiv răspunsurile țesuturilor și de a minimiza biodegradarea plasează adesea restricții asupra materialelor care pot fi utilizate în siguranță în mediile orale și tisulare. Proiectarea unor biomateriale optime este deseori dificilă din cauza cerințelor impuse de mediul din organismul viu și de restaurare.

În ultimele decenii, definițiile biocompatibilităților materiale au evoluat și reflectă o opinie în continuă schimbare legată de filozofiile tratamentului cu implant chirurgical. În general, definiția biocompatibilității a fost dată ca un răspuns adecvat la un material (biomaterial) din cadrul unui dispozitiv pentru o aplicație clinică specifică. Materiale implantabile metalice și nemetalice au fost studiate în domeniul ortopediei secolul XX.

În anii 1960, dispozitivele dentare au fost recunoscute ca fiind într-o fază de cercetare și dezvoltare, iar recenziile longitudinale critice ale aplicațiilor clinice au fost puternic recomandate. În acest timp, studiile de longevitate ale diferitelor dispozitive au demonstrat că cea mai lungă durată a aplicațiilor clinice a fost pentru proteze ortopedice.

În anii 1980, studiile clinice controlate au arătat că implanturile dentare asigurau longevități funcționale care depășeau majoritatea celorlalte tipuri de modalități funcționale de înlocuire a țesuturilor. În mod clar, aceste studii clinice au influențat puternic atât cercetarea, dezvoltarea, cât și procesele de aplicare clinică. În prezent, creșterea exponențială a utilizării implanturilor și a rapoartelor științifice aferente susțin opiniile exprimate de vizionarii timpurii în urmă cu câteva decenii.

Modalitățile de implant folosite au ținut cont de: biomateriale; analize biomecanice ale desenelor, țesuturilor și funcției; vindecarea rănilor de-a lungul interfețelor; metode chirurgicale de minimizare a traumatismelor mecanice, chimice și termice; modalități de tratament de restaurare și întreținere prostodontice și parodontale; și protocoale pentru studii clinice multidisciplinare controlate. Ar trebui recunoscută interdependența tuturor etapelor cercetării de bază și aplicată. Toate interrelaționează și trebuie să evolueze pentru a oferi un nivel mai bun de înțelegere a fenomenelor fizice și biologice de bază asociate cu sistemele de implant înainte ca rezultatele clinice mai lungi să fie descrise complet.

Evaluările implanturilor dentare endosteale și subperiosteale ridică întrebări interesante cu privire la interrelațiile dintre selecția materialului și design. Există oportunități de a selecta un material dintr-o serie de sisteme, cum ar fi metale, ceramică, carboni, polimeri sau compozite. În plus, numai dimensiunile anatomice disponibile și cerința de a atașa o formă de dispozitiv de restaurare intraorală limitează forma și forma (design) a implantului. Datorită gamei largi de proprietăți biomateriale demonstrate de clasele de materiale disponibile, nu este recomandată fabricarea unui nou proiect de implant fără o analiză biomecanică minuțioasă. O altă abordare folosită acum este de a determina un proiect specific bazat pe considerente clinice și apoi de a selecta biomaterialul ales din analizele computerizate. Siguranța acestor combinații poate fi apoi demonstrată prin investigații de laborator și animale. Studiile clinice controlate după protocoalele prospective oferă, desigur, evaluarea finală atât pentru siguranță, cât și pentru eficacitate. Succesul pe termen lung este astfel determinat clinic în studiile de urmărire a investigatorilor și este în mod clar un domeniu care trebuie subliniat pentru multe sisteme de implant dentare disponibile.

Aliajele pot fi, de asemenea, clasificate în funcție de componenta lor principală, de exemplu, un aliaj pe bază de aur. Ele pot fi, de asemenea, descrise prin aspectul lor, cum ar fi galben sau alb. Aliajele aurii albe nu sunt, desigur, albe, ci argintii.

Metalele de bază se referă la metale care nu sunt nobile, de ex. titan, nichel, cupru, argint și zinc. Aceste elemente corodează mai mult decât aliajele nobile, dar sunt aliate cu metale nobile, deoarece au un efect semnificativ asupra proprietăților aliajului, cum ar fi creșterea rezistenței, scăderea flexibilității și creșterea rezistenței la uzură a aliajului.

Aliajul este adăugarea unuia sau mai multor elemente metalice la metalul primar sau matricial. Incorporarea acestor metale suplimentare modifică și îmbunătățește frecvent proprietățile mecanice ale aliajului. Aceste proprietăți pot varia foarte mult de la componentele metalelor.

Aliajele pot fi denumite binare, ternare sau cuaternare. Aceasta înseamnă că au două, trei sau patru componente metalice, respectiv (comparativ cu amalgamul).

Tipuri de aliaje

Metalele utilizate în aliajele dentare pot fi împărțite în două categorii: metale nobile și metale de bază. Exemple de metale nobile sunt aurul, platina, rodiul, ruteniul, iridiul și osmiul. Astfel de elemente sunt bune pentru utilizare dentară, deoarece sunt rezistente la coroziune în mediul ostil al gurii. Din punct de vedere chimic, argintul este un metal nobil, dar în ceea ce privește stomatologia, acesta nu este considerat, deoarece corodează în gură. Aceste elemente precedente sunt uneori denumite metale prețioase, deoarece tind să fie scumpe. Acest termen poate fi confuz, deoarece nu se referă doar la costuri și, prin urmare, trebuie utilizat cu atenție. În egală măsură, aceasta nu înseamnă nobil ca în elementele nobile, deoarece argintul și paladiul nu sunt metale prețioase dentare. Termenul este mai descriptiv al proprietăților fizice ale aliajului. Nobilimea aliajului depinde de suma cantității de elemente nobile conținute în el. Asociația Dentară Americană a definit aliajele ca aliaje cu metale nobile, nobile și metale de bază (tabelul 1).

Tabelul 1 Definiția aliajelor cu metale nobile, nobile și metale de bază în funcție de procentul de metale nobile prezente

Tip aliaj	Conținut metal nobil
Înalt nobil	Conține cel puțin 40% din greutate aur și cel puțin 60% din greutatea elementelor metalice nobile (aur, iridiu, osmiu, platină, rodiu)
Nobil	Conține mai mult sau echivalent de 25% în greutate metale nobile
Metal de bază	Conține mai puțin de 25% din greutatea metalelor nobile

Marea majoritate a aliajelor nobile au în componența aur. Așa cum am menționat anterior, aurul pur este prea moale pentru a fi utilizat singur în stomatologie și pentru a obține proprietăți mecanice adecvate, trebuie aliat cu alte elemente. Cele patru tipuri de aliaje de turnare de aur utilizate în stomatologie sunt rezumate în tabelul 2.

Creșterea durității este însoțită de o scădere a ductilității și a rezistenței la coroziune. Elementul principal responsabil pentru acest lucru este cuprul. Cuprul transmite întărirea în ordine a aliajului. Acesta este locul în care atomii de cupru formează grupuri ordonate în loc să fie distribuite aleatoriu în aliaj. Această structură atomică ordonată împiedică mișcarea sau alunecarea straturilor de atomi. Pentru ca acest fenomen să se producă, aliajul trebuie să conțină cel puțin 11% cupru și astfel se va observa un anumit efect în aliajele de aur de tip III, deși se vede mai mult cu tipul IV. Cantitatea de cupru adăugată funcționează numai până la un punct, deoarece aliajul se va pătrunde dacă conține mai mult de 16% cupru. Întărirea se poate realiza prin încălzirea aliajului la 400 ° C și menținerea acestuia în cuptor la această temperatură timp de 30 de minute.

Un aliaj de aur poate fi înmuiat prin același procedeu. Temperatura este mai mare decât cea utilizată pentru întărirea la comandă, iar aliajul este răcit rapid prin stingere.

Alți componenți

Platina și paladiul au efecte similare asupra proprietăților aliajului de aur final. Includerea lor în aliaj duce la un punct de topire mai mare. Acest lucru poate fi avantajos dacă aliajul necesită să fie lipit la un moment dat, de exemplu, pentru a uni unele componente ale punții, în cazul în care

tehnicianul este preocupat de faptul că o turnare mare nu poate fi suficient de precisă dimensional dacă este turnată ca o singură unitate.

Zincul este inclus ca un epiderm de oxigen, deoarece va reacționa în mod preferențial cu oxigenul, prevenind astfel oxidarea celorlalte componente. Este relativ reactiv, iar zincul pur va prelua oxigenul pentru a pasiva suprafața. Este inclus în aliajele metalelor nobile din același motiv ca în amalgamul dentar.

Iridiul și ruteniul sunt utilizate în principal pentru a ajuta la rezistența la coroziune. Sunt încorporate în cantități foarte mici.

Tabelul 2 Cele patru tipuri de aliaj de turnare din aur folosit în stomatologie

Tip	Descriere	Compoziție %					
		Aur	Argint	Cupru	Platină	Paladiu	
I	Moale	80-90	3-12	2-5	0	0	
II	Mediu	75-78	1-15	7-10	0-1	1-4	
III	Tare	62-78	8-26	8-11	0-3	2-4	
IV	Extra	60-70	4-20	11-16	0-4	0-5	

Ruteniu este un element chimic cu simbolul Ru și numărul atomic 44. Este un metal de tranziție rar din familia platinei din tabelul periodic. Ca și celelalte metale ale grupului de platină, ruteniul este inert față de majoritatea altor substanțe chimice. Ruteniul este de obicei găsit ca o componentă minoră a minereurilor de platină, este un metal semiprețios fragil, cu topire ridicată..

Grupurile majore de materiale implantabile pentru stomatologie sunt titanul și aliajele, aliajele de crom cobalt, oțelurile austenitice Fe-Cr-Ni-Mo, aliajele de tantal, niobiu și zirconiu, metale prețioase, ceramică și materiale polimerice.

Cel puțin un producător (NobleBond; Argen) a răspuns la preocupările de mai sus producând un aliaj pe bază de cobalt cu cantități mari de ruteniu. Ruteniul (Ru) este un metal nobil din familia platinei, cu o excelentă rezistență la coroziune, dar este considerabil mai ieftin decât aurul și platina. Acest aliaj conține 40% cobalt, 25% ruteniu și 24% crom. Deși performanțele clinice ale acestui aliaj rămân a fi văzute, progrese precum acestea pot permite clinicienilor să folosească aliaje alternative, cum ar fi metale pe bază de paladiu și ruteniu, pentru restaurarea clinică a implanturilor (Figura 1).

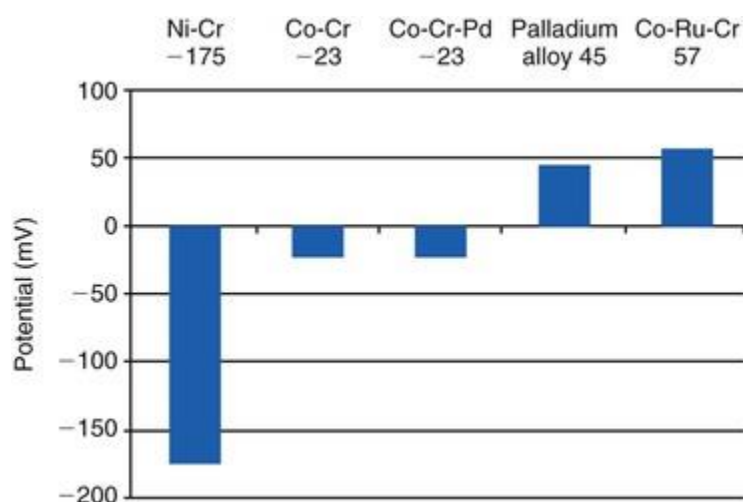


FIGURA 1 Coroziunea aliajelor cuplate cu titan. Metalele de bază cuplate cu titanul prezintă proprietăți de coroziune inferioare în comparație cu metalele nobile aliajul de paladiu și aliajul Co-Ru. (Sursa: Argen Corporation.)

Mecanic, titanul este mult mai ductil (îndoit) decât aliajul de titan. Această caracteristică a reprezentat un aspect foarte favorabil legat de utilizarea titanului pentru dispozitivele cu formă de placă endostală. Necesitatea de ajustare sau îndoire pentru a furniza bonturi paralele pentru tratamentele protetice a determinat producătorii să optimizeze microstructurile și condițiile reziduale. Îmbinarea, ștampilarea sau forjarea urmată de tratamente termice de recoacere controlate sunt utilizate în mod obișnuit în timpul procesării metalurgice. Cu toate acestea, dacă un bont de implant este îndoit în momentul implantării, atunci metalul este încordat local la nivelul gâtului (îndoit), iar tulpina locală este atât cumulativă, cât și dependentă de cantitatea totală de deformare introdusă în timpul procedurii. Acesta este un motiv, în afară de încărcarea anterioară a ciclului de oboseală, de ce nu este recomandată reutilizarea implanturilor. În plus, procesele mecanice pot altera sau pot contamina în mod semnificativ suprafețele implantului. Orice reziduuri ale schimbărilor de suprafață trebuie îndepărtate înainte de implantare pentru a asigura condiții de curățare mecanică și chimică.

Tehnicile emergente de turnare de titan și aliaje de titan rămân limitate pentru aplicarea implantului dentar din cauza punctelor de topire ridicate ale elementelor și înclinației pentru absorbția oxigenului, a azotului și a hidrogenului, care pot provoca o încadrare metalică. O atmosferă de gaz de protecție ridicată sau ultrapură permite producerea de piese turnate în titan și aliajele sale la diferite niveluri de puritate, deși microstructurile și porozitatea sunt relativ nefavorabile legate de oboseala și rezistența la fractură. Rezistențele tipice ale turnării din punct de vedere comercial pur (CP) titan grad 2 și Ti-6Al-4V după tratamentul termic și recoacere pot fi în gama celor din aliaj de titan forjat utilizat pentru implanturi dentare.

Un aliaj dentar de cobalt-crom destinat utilizării restaurărilor din porțelan-topit-metal, care constă în principal din: Cobalt 40-60 + Crom 20-30 + Ruteniu 5-15 + Aluminiu 1-4 + Titru 0-0.15 + Tungsten 0-15 + Molibden 0-6.5 + Niobiu 0-3.0 + Zirconiu 0-0.25 + Mangan 0-1.5, în care suma constituenților este egală cu 100% și suma constituenților de tungsten și molibden, minus suma constituenților de ruteniu, niobiu și zirconiu este mai mică de aproximativ 5%. Aceste aliaje prezintă proprietăți fizice și chimice deosebite, inclusiv formarea unei legături tenace cu porțelanul fără a fi nevoie de un agent de legare separat și pot fi utilizate în mod avantajos ca înlocuitori pentru aliajele care au o proporție ridicată de metale prețioase, precum și pentru nichel. aliaje pe bază de crom în fabricarea de poduri și coroane fixe furniruite din porțelan.

Aliaje rezistente la uzură de zirconiu-paladiu-ruteniu

Majoritatea compușilor intermetalici care se cristalizează în configurația cubică centrată pe corp, ordonată atomic, cunoscută sub denumirea de structură de tip B2, sunt prea fragile pentru a permite îndoirea sau deformarea fără riscul de fractură. Dar există câțiva compuși de acest tip care pot fi ușor modelați și chiar atrași în sârmă. Printre aceștia se numără compusul de tip B2 NiTi (Nitinol), care este suficient de ductil pentru a fi tras în sârmă și are câteva proprietăți mecanice remarcabile, cum ar fi bine-cunoscutul „efect de memorie” (1) și așa-numitul „pseudoelastic” comportament. Sursa comportamentului neobișnuit al acestui compus constă într-o transformare a fazelor difuzate (martensitice), care apare în mod normal la sau aproape de temperatura camerei atunci când compusul este răcit și, mai important, poate fi indusă de stres. O transformare martensitică similară cu cea din NiTi apare în compusul de tip B2 ZrPd, care este compus din elemente din poziții corespunzătoare celor din titan și nichel din tabelul periodic, cu excepția faptului că acestea sunt din a doua și nu din prima perioadă lungă. Din păcate, compusul ZrPd se transformă la 620 ° C și nu este în mod special ductil la temperatura camerei. Am fost curioși să vedem dacă se poate obține o ductilitate sau un alt comportament mecanic interesant în aliajele de zirconiu-paladiu pur și simplu folosind adaosuri ternare sau cvasi-binare pentru a stabiliza structura B2 cu temperaturi ridicate (austenitice) la temperatura camerei. Ruteniul a fost ales ca al treilea element, deoarece se combină cu zirconiu pentru a forma compusul ZrRu, de structură de tip B2, care este stabilă de la temperatura camerei până la punctul său de topire. Mai mult decât atât, atomii de ruteniu păreau să se substituie liber pentru atomii de paladiu pe siturile de grilă B2, din cauza asemănărilor cu dimensiunea și structura electronică. Măsurările de rezistență la o serie de aliaje topite cu arc în condiții „turnate”, a se vedea figura 1, a evidențiat o bruscă minim chiar înainte de debutul transformării martensitice la temperatura camerei (figura 2). Difracția cu raze X a stabilit că există o soluție solidă B2 extinsă din compoziția ZrRu ($x = 0$) până la aproximativ Zr50 (Pd35 Ru15), ($x = 0,7$). S-a observat o modificare treptată, dar pronunțată, de la un comportament fragil la cel ductil, deoarece raportul dintre atomi de paladiu și ruteniu a crescut pe siturile de zăbrele B2.

Niciunul dintre elementele prezente nu este cunoscut pentru a produce reacții toxice în țesuturile vii. Măsurările de expansiune termică cu temperatura au arătat că aliajele atermice martenum-ruteniu au o histereză mare (~ 200 ° C) la încălzire și răcire.

Rata de uzură ușor negativă a aliajului zirconiu-paladiu-ruteniu se poate datora formării de ZrO₂.

Prima serie de forme structurale pentru implanturi dentare a inclus tije și conuri pentru umplerea site-urilor de extracție a rădăcinilor dinților (reținători de creastă) și, în unele cazuri, implanturi endosteale purtătoare de sarcină. Limitările caracteristicilor proprietății mecanice au condus curând la întărirea CPC implanturi prin tehnici mecanice (tije metalice centrale) sau fizico-chimice (acoperire peste un alt substrat).

Numărul de acoperiri ale suprafețelor metalice folosind pulverizare cu flacără sau cu plasmă (sau alte tehnici) a crescut rapid pentru CPC. profiluri și longevități ale implantului.

Protocol experimental

Testarea materialelor se va face pe un model animal cât mai apropiat de om, care să reproducă fidel aspectele patologiei.

Utilizarea și alegerea modelului animal în cercetarea medicală și, mai ales, în studiul biomaterialelor cu rol regenerativ, este o etapă extrem de importantă, întrucât experimentul trebuie să respecte regula celor „3 R” (**R**eplacement, **R**eduction, **R**efinement) (W. M. S. Russell and R. L. Burch in 1959) și în plus translaționarea rezultatelor de la animalul de experiență la om trebuie să fie posibilă.

Materialul/ materialele luate în studiu vor fi pe rând testate „in vitro” „in vivo” și „in situ”.

Testarea „in vivo” va urmări două direcții principale: biocompatibilitate tisulară și resorbție pentru biomaterialul implantat.

Pentru a urmări reacția organismului la biomaterialele propuse până la testarea "in situ", acestea vor fi testate "in vivo", prin implantare la animalele de experiență la nivelul membrului posterior, regiunea femurală.

Biocompatibilitatea in vivo a aliajelor dentare și a protezelor dentare metalo-ceramice

Implanturile orale sunt considerate dispozitive protetice de mare succes. Ele înlocuiesc cu succes funcția dinților și restaurează estetica și fac acest lucru cu o rată de eșec / complicație remarcabil de mică. Având în vedere aceste caracteristici atrăgătoare, este de înțeles că, în ultimul deceniu, cererea de implanturi orale a crescut drastic. Cu această creștere precipitantă a apărut o gamă uluitoare de modificări ale implantului, toate concepute pentru a îmbunătăți procesul de osseointegrare. Aceste modificări includ ajustări în timpul încărcării, variații ale caracteristicilor de suprafață, modificări ale formei implantului și adăugarea factorilor de creștere sau a altor stimuli biologici destinați "activării" suprafeței implantului. Cu toate acestea, măsura în care majoritatea acestor modificări îmbunătățește osseointegrarea implantului nu este cunoscută.

În consecință, este oarecum o surpriză că marea majoritatea studiilor experimentale privind osseointegrarea orală a implantului se realizează în oase lungi, mai degrabă decât pe maxilar sau mandibulă. Cele mai frecvent citate motive pentru efectuarea analizelor implanturilor orale în oase lungi sunt dimensiunea lor relativă și accesibilitatea ușoară (Popelut et al., 2010; Yan et al., 2011; Sennerby et al., 1993).

Oasele lungi conțin, de asemenea, o cavitate mare foarte pro-osteogenă, care facilitează formarea rapidă a osului în jurul unui implant (de Barros et al., 2010; Leucht et al., 2007). Mai mult, studiile efectuate pe șoareci demonstrează că spațiul măduvei este în primul rând responsabil pentru generarea acestui nou os de periimplant (Popelut et al., 2010; Leucht et al., 2007; Colnot et al., 2007).

Folosirea câinilor pentru osteointegrarea implantului oral prezintă un avantaj semnificativ deoarece implanturile de dimensiuni umane pot fi testate direct pe câine. Cu toate acestea, există o serie de limitări grave, inclusiv costul asociat unui studiu amplu cu canini și lipsa completă de informații genetice, moleculare și celulare pentru analize.

Experimentele *in vivo* au demonstrat că un complex de ruteniu (II) [Ru (dmp) 2 (ipad)] (ClO₄) 2 a inhibat dependența de doză a unei linii celulare de carcinom de ficat uman (BEL-7402) care a fost xenotransplantată la șoarecii nuzi. Analizele au arătat că acest complex a indus apoptoza în celulele țesutului tumoral dar cu efecte toxice asupra celulelor rinichilor, sângelui și măduvei osoase la șoarecii tratați. O examinare toxicologică a indicat faptul că doze mari de Ru pot provoca leziuni renale și pot duce la creșteri ale creatininei serice. În plus, Ru părea a fi genotoxic și toxic hematologic într-o manieră dependentă de doză. Rezultatele obținute au furnizat informații de bază referitoare la proiectarea ulterioară a medicamentelor antitumorale de ruthenium (II) (Wang et al., 2018).

Potențialul anticancer al complexelor de ruteniu a fost investigat pe scară largă, însă studiile de evaluare a siguranței sunt încă puține. În ciuda agenților antineoplazici pe bază de ruthenium, se știe că provoacă mai puține efecte secundare comparativ cu alte medicamente pe bază de metale, acești compuși nu sunt complet lipsiți de toxicitate, cauzând în principal nefrotoxicitate. Pe baza rezultatelor promițătoare ale activității antitumorale a complexelor [Ru (L-Met) (bipy) (dppb)] PF6 (RuMet) și [Ru (Lpp)] PF6 (RuTrp) prima dată am investigat profilul de toxicitate al acestor complexe la rozătoare și peștii zebură.

Toxicitatea orală acută a fost evaluată la șoareci elvețieni. Potențialul mutagen și genotoxic a fost determinat printr-o combinație de protocole Micronucleus (MN) și Comet, după expunerea șoarecilor elvețieni la RuMet și RuTrp în doze terapeutice. Au fost expuse la aceste complexe embrionii din zebrafish, iar dezvoltarea acestora a fost observată până la 96 ore după fertilizare. Complexele RuMet și RuTrp au prezentat o toxicitate acută orală redusă.

Nu au fost înregistrate modificări comportamentale, nici modificări morfologice macroscopice sau modificări structural, în ficat și rinichi. Aceste complexe nu au provocat toxicitate genetică, prezentând o lipsă de formare a micronucleilor și o inducție redusă a deteriorării ADN în celulele de

la șoareci elvețieni. În contradicție, tratamentul cu cisplatină a prezentat o mutagenitate și o genotoxicitate ridicată. RuMet și RuTrp au prezentat o toxicitate scăzută în dezvoltarea embrionului de zebură. Complexele RuMet și RuTrp au demonstrat o toxicitate scăzută în cele două modele de studiu, o proprietate interesantă în studiile preclinice pentru medicamentele anticanceroase noi (Mello-Andrade et al., 2018).

Recent, s-a constatat că o serie de complexe de ruteniu tiazolo- arenă cu o intensitate citotoxică in vitro, atât pe celulele cancerigene ovariene care sunt sensibile la cisplatină, cât și pe cea a cisplatinei.

Complexul de ruteniu a fost administrat pe șobolani femele Cr1: WI pe cale orală, prin intubare gastrică și injectare intraperitoneală. Parametrii hematologici și modificările histopatologice ale ficatului, rinichilor, splinei și creierului au fost investigate după un tratament de 14 zile. Substanța a fost bine tolerată pe cale orală, cu o valoare LD50 de peste 2000 mg / kg greutate corporală.

Simptomele au fost observate numai în prima zi după administrarea intraperitoneală a celei mai mari doze, cu o valoare LD50 între 300 și 2000 mg / kg corp. Profilul hematologic nu a fost modificat la niciuna dintre dozele testate, după administrarea acută orală și intraperitoneală. Modificările structurale (limfocitoliză moderată) au fost identificate numai în splina la cea mai mare doză testată. În concluzie, complexul de tiazolo arenă de ruteniu a fost foarte bine tolerat oral și a avut o toxicitate acută scăzută după administrarea intraperitoneală la șobolani Cr1: WI (Grozav et al., 2016).

Reacția tisulară va fi urmărită prin examene histopatologice utilizând colorații uzuale la intervale de 24h și 7, 14 și 30 zile de la implantare. Gradul de resorbție al materialului se va aprecia prin morfometrie.

Rezultatele testării "in situ" se vor obține prin coroborarea datelor obținute la examenul imagistic (radiologic, computer-tomografie, microCT) cu datele examenului histopatologic din regiunile implantate cu material.

Examenul radiologic poate fi sub forma radiografiei sau radioscopiei. Radiografia presupune obținerea unei imagini pe film clasic, sau la momentul actual, pe suport digital – imagine electronică.

Etape ale examenului radiologic

- Examen clinic pentru identificarea zonei de radiografiat
- Poziționarea pacientului și stabilirea parametrilor radiologici
- Expunerea radiologică propriu-zisă
- Developarea sau obținerea imaginii digitale
- Prelucrarea imaginii, interpretarea, arhivarea, utilizarea datelor într-un context clinic

sau de cercetare

Poziționarea pacientului veterinar pe masa radiologică

Menținerea animalului într-o anumită poziție pe masa de radiografie, este importantă pentru protejarea sănătății personalului medical și chiar a animalului, precum și pentru calitatea imaginii; de multe ori se recomandă folosirea anesteziei. Pentru poziții ceva mai speciale se poate apela la diferite dispozitive de fixare a animalului.

Pregătirea aparatului Roentgen pentru expunere

În cadrul tehnicii de radiografiere a animalelor mici, distanța focar optic - film variază între 70-90 cm, pentru majoritatea situațiilor; acest parametru se poate reduce și la 60 de cm, atunci când este vorba de radiografie la animale de talie foarte mică (rozătoare de companie, peruși etc).

În funcție de talia pacientului și de regiunea care va fi radiografiată, se ajustează parametrii de bază a oricărei instalații radiologice: tensiunea prin kilovoltaj și intensitatea prin miliamperaj; în medicină, expunerea radiologică este exprimată și prin raportul miliamperaj/secunde (mAs). Se aleg incidențele necesare, se poziționează pacientul, se stabilesc parametrii radiologici din pupitrul de comandă și se realizează expunerea.

Expunerea radiologică medicală presupune prezența doar a pacientului în sala de radiologie (sau și a unei persoane ajutoare ce poartă echipament de protecție). Parametrii radiologici pot avea valori mai mari sau mai mici, decizia aparținând radiologului. În general, pentru țesuturile moi și

conținut ridicat de gaze se folosesc parametri cu valori ridicate (stomac, pulmoni), iar pentru țesuturile dure (oase) se folosesc parametri cu valori mai reduse.

Pentru examinarea **radiologică** a pacientului care a fost supus unui implant subcutanat/intradermic, acesta este poziționat în decubit lateral drept sau stâng ori dorso-ventral/sterno-abdominal; în cazul decubitului dorso-ventral/sterno-abdominal, se poate urmări localizarea implantului (în ziua implantării) și dacă poziția acestuia s-a modificat (la un anumit interval de timp).

Radiologic, țesutul implicat în urma implantării unui metal poate sau nu suferi modificări.

Perifocal implantului pot apărea arii de radiotransparență specifică gazului acumulat în caz de infecție sau proces necrotic, radioopacitate crescută în caz de formare a granulomului de corp străin, edem, chistizare sau calcifiere; în ultimul caz radioopacitatea este de tip minerală și se poate confunda cu opacitatea materialului implantat. Diferențierea se face prin cunoașterea dimesniunilor și formei materialului care a fost implantat.

Prin utilizarea tehnicii digitale se pot realiza și măsurători exacte ale implantului și ale reacției date de acesta.

Ecografia țesuturilor moi

La momentul actual, în ecografie, se pot obține imagini ultrasonografice, folosind sonde speciale; tehnica se numește ecografie a țesuturilor moi.

Pentru examenul ecografic al țesutului cutanat, pacientul poate fi poziționat în decubit lateral, pe partea dreaptă sau stângă, patrupodal sau sterno-abdominal, în funcție de aria de interes. Din punct de vedere ecografic, țesutul cutanat are aspect anecogen. În caz de implant cu un anumit tip de metal se pot forma granuloame de corp străin, edeme, se poate acumula gaz (în caz de infecție sau proces necrotic), pot apărea calcifieri sau chiști.

Granulomul de corp străin se identifică ecografic cu hipoecogenitate tisulară cu centru hipoecogen.

Acumularea gazului în caz de infecție sau proces necrotic oferă aspect septat al țesutului cutanat, cu pereți subțiri și conținut fluid (izoecogen).

Edemul are zone anecogene sau hipoecogene, iar metalul implantat are aspect hiperecogen.

Pentru a putea evalua din punct de vedere histopatologic reacția tisulară la toate animalele din lot care au fost supuse experimentării chirurgicale, acestea vor fi eutanasiate treptat după un protocol bine stabilit, astfel ca de la început și până la final să putem evalua gradul de biocompatibilitate, dar și de resorbție al material implantat.

Se va urmări eventuala reacție inflamatorie, gradul de resorbție al materialului, evaluare cantitativă și calitativă.

S-a efectuat testarea materialelor pe o perioadă de 2-3 luni pentru a observa gradul de resorbție al biomaterialului, pentru diverse clase de aliaje reprezentative din sistemele Ru, cu concentrația "n" optimă de Ru și stabilirea unor noi de clase de aliaje ternare cu utilizare în stomatologie și efectele lui terapeutice.

Proiect 4. **ALIAJE BIOCOMPATIBILE CU ENTROPIE RIDICATA PENTRU APLICAȚII MEDICALE**, acronim **HEAMED** Responsabil Conf.dr.GetaPavel
TESTELE IN VITRO

**Hemocompatibilitatea in vitro a noilor aliaje cu entropie ridicată
(FeMoTaTiZr, MoNbTaTiZr)**

Hemocompatibilitatea ca parte a fenomenului de biocompatibilitate, este un test de evaluare inițială pentru a evidenția efectele biologice ale implanturilor care vin în contact cu sângele circulant sau non-circulant. În general, materialele concepute pentru implanturi, ca și corpurile străine de organismul uman sau animal cunoscute ca non-self, sunt incompatibile cu sângele, determinând in vivo trei principale alterări care implică celulele sanguine:

- Hemoliza (distrugerea globulelor roșii);
- Efectul trombogenic (activarea plachetelor sanguine și a factorilor plasmatici ai coagulării);
- Inflamația (acumularea focală a globulelor albe mononucleare și polimorfonucleare implicate în procesul de aparare față de non-self).

O importanță deosebită în testarea biomaterialelor o are rezistența lor la coroziune în medii biologice, fiind necesară minimizarea cantității de ioni metalici eliberați în organism.

În prezentul studiu, s-a testat hemocompatibilitatea in vitro a două aliaje cu entropie ridicată: FeMoTaTiZr, MoNbTaTiZr prin determinarea hemolizei și a coagulabilității sângelui proaspăt recoltat de la animale sănătoase.

2. Protocolul experimental

2.1. Pregătirea biomaterialelor

Materialele cu entropie ridicată preparate în cadrul Universității Tehnice București au următoarea compoziție chimică, conform analizelor EDS:

Proba S1: FeMoTaTiZr - (Fe = 15,46%; Mo=20,45%; Ta=32,45%; Ti = 12,67%; Zr=18,97%) (%masice);

Proba S2: MoNbTaTiZr - (Mo=17,32%; Nb=13,07%; Ta=38,95%; Ti = 13,21%; Zr=17,45%) (%masice).

Din lingourile pregătite s-au taiat bucăți mici de material, obținându-se piese cu margini neregulate și porozitate accentuată din proba S1 și piese cu margini drepte și porozitate mai redusă din proba S2. O parte dintre piese, cu diam de 0,50-1,00 cm diametru și grosime de 1-2 mm au fost polisate pentru a reduce efectul de suprafață rugoasă (fig.1).

Piesele astfel obținute, au fost spălate cu apă bidistilată de 5 ori, apoi degresate cu acetonă 30 minute și sterilizate prin fierbere timp de 1 oră.

2.2. Pregătirea probelor de sânge

Probele de sânge s-au recoltat de la câini sănătoși prezentați pentru controale de rutină în cadrul clinicii de Boli Interne a USAMV Iași și de la cai aflați în îngrijire temporară în cadrul clinicii de Chirurgie a USAMV Iași.

De la animalele sănătoase din punct de vedere clinic s-au recoltat probe de sânge pe EDTA și citrat de sodiu 3,8 %, conform tehnicii vacutainer.

2.3. Testele de hemocompatibilitate

Conform standardului ISO 10993-4 (2006), testele in vitro selectate pentru a evidenția efectele biomaterialelor asupra celulelor și plasmei sanguine sunt: testele de hemoliză, testele de formare a trombusului, testele de coagulabilitate sanguină și testele imunologice. În prezentul studiu, s-au urmărit efectele celor două biomateriale S1 și S2 puse în contact cu 10 probe de sânge de câine recoltat pe EDTA și 10 probe de sânge de cal recoltat pe citrat de sodiu, determinându-se parametrii

hematologici eritrocitari, leucocitari și trombocitari din sângele total, ca și parametri de coagulabilitate din plasma sanguină. Efectele urmărite au fost:

- hemoliza, evidențiată prin modificarea parametrilor eritrocitari (RBC –red blood cells, HGB- hemoglobina, HTC – hematocritul, VEM – volumul globular mediu al eritrocitelor CHEM – concentrația în hemoglobina eritrocitară medie);

- agregabilitatea eritocitară, leucocitară și trombocitară, evidențiate direct pe frotiuri de sânge și indirect prin efectele citopenice globale (modificarea numărului leucocitelor sau WBC - white blood cells și a numărului plachetelor sanguine - PLT);

- coagulabilitatea sanguină, evidențiată prin determinarea TP – timp de protrombină, TTPA – timpul de tromboplastină parțială activată și dozarea fibrinogenului (FBN).

Parametrii hematologici s-au determinat în cadrul Laboratorului Clinic al USAMV Iași, cu ajutorul analizatorului automat Abaxis Vet Scan HN5. Indicatorii de coagulabilitate s-au determinat în cadrul laboratoarelor Bioclinica Iași.

2.3.1. Testarea hemolizei și agregabilității celulare

Activitatea hemolitica și agregabilitatea celulară generate de aliajele testate s-au determinat prin contactul direct al acestora cu sângele. Probele de sânge, recoltat pe EDTA, s-au împărțit în 3 tuburi test: T1 martor, T2 sânge în care s-a imersat biomaterialul nepolișat și T3 sânge în care s-a imersat materialul polișat. Tuburile test s-au incubat timp de 3 ore la 37°C, apoi piesele metalice s-au extras, iar sângele s-a utilizat pentru investigații hematologice. Determinările cantitative privind parametrii eritrocitari, leucocitari și trombocitari s-au determinat cu ajutorul analizatorului automat, iar modificările morfologice celulare s-au observat prin examinarea microscopică a frotiurilor sanguine preparate din fiecare tub test și colorate printr-o metodă specifică de colorare a sângelui – metoda rapidă Diff-Quick.

2.3.2. Testarea coagulabilității sanguine

Testarea coagulabilității sângelui se bazează pe activarea in vitro a sistemului de coagulare al plasmăi sanguine, fiind posibilă evaluarea diferențiată a celor 2 căi de inițiere a cascadei de coagulare, precum și a căii finale prin care fibrinogenul plasmatic (factorul I al coagulării) se transformă în fibrină insolubilă.

Astfel, timpul de protrombină (TP), denumit și timpul Quick (TQ) după numele celui care l-a descris prima dată, este timpul necesar coagulării plasmăi la adaosul unui factor extrinsec (factorul III sau tromboplastina tisulară). TP verifică așadar coagulabilitatea sângelui pe cale extrinsecă, cu alte cuvinte, verifică dacă în plasmă există principalul factor al căii extrinseci (factorul VII) și factorii proteici ai căii comune finale (I, II, V și X).

Timpul de tromboplastină parțială activată (TTPA) este testul ce măsoară activitatea căii intrinseci a coagulării (în care sunt implicați mai mulți factori ce se activează la contactul cu buzele rugoase ale plăgii vaculare: prekalicreina, HMWK- high molecular weight kininogen, factorii XII, XI, IX și VIII, ultimul fiind factorul antihemofilic A), precum și activitatea factorilor ce aparțin căii comune a coagulării (I, II, V și X)

Cheia cascadei de reacții a coagulării sângelui este transformarea factorului II – protrombina, în trombină activă, aceasta având nu doar rolul de a transforma fibrinogenul în fibrină, ci și de activator al plachetelor sanguine, de ligand al glicoproteinelor de suprafață din membrana plachetară, generând punți de fibrinogen între plachete și endoteliul vascular lezionat sau biomaterial.

În acest studiu, sângele recoltat pe citrat de sodiu, ca și în cazul anterior s-a separat în trei tuburi test – T1 martor, T2 sânge cu biomaterial nepolișat și T3 cu biomaterial polișat. Tuburile test s-au incubat timp de 30 min la 37°C, apoi s-a efectuat determinarea parametrilor de coagulare: TP, TTPA și dozarea fibrinogenului.

3. Rezultate și discuții

3.1. Rezultatele testelor de hemoliză și agregabilitate celulară

Hemoliza reprezintă un fenomen de distrugere a hematiilor (RBC – red blood cells), ca urmare a acțiunii unor agenți fizici (variații termice, agenți mecanici) agenți chimici (modificarea presiunii osmotice a plasmii sanguine, plumb, moliibden) sau biologici (microorganisme de tipul micoplasmelor hemotrope, toxinelor bacteriene sau paraziților endoglobari).

Hemoliza determină o reducere a numărului de hematii și a hematocritului, precum și eliberarea hemoglobinei în plasma sanguină și creșterea concentrației în hemoglobină eritocitară medie (CHEM).

Rezultatele obținute evidențiază o reducere nesemnificativă a numărului de eritrocite atât la sângele de câine (o reducere a RBC cu $0,12-0,22 \times 10^6/\mu\text{l}$), cât și la cel de cal (o reducere a RBC cu $0,22-0,64 \times 10^6/\mu\text{l}$), sub influența ambelor aliaje testate.

Aliajul S1 cu conținut în Fe și Mo, determină scăderea corelată a hematocritului, deoarece eritrocitele rămân nemodificate ca volum (în cazul materialului cu suprafață rugoasă). Nu același lucru se întâmplă cu HGB care rămâne nemodificată raportată la volum total de sânge, dar înregistrează o creștere raportată la masă eritocitară (CHEM mai ridicat în tubul test T2 cu 0,8 g/dl masă eritocitară în sânge de câine, iar în sânge de cal, cu 1,38 g/dl masă eritocitară). Aceste diferențe relevă prezența fenomenului de hemoliză in vitro sub acțiunea aliajului S1 cu suprafață rugoasă. Deși efectul hemolitic s-a evidențiat și sub acțiunea aceluiași aliaj S1 nepolișat (tub test T3), indicele de hemoliză este mai redus (CHEM crescut cu 0,50 g/dl masă eritocitară în sânge de câine, iar în sânge de cal, cu 1,05 g/dl masă eritocitară). În plus, modificarea VEM-ului în T3 releva o modificare de permeabilitate a membranei eritocitare sau a presiunii osmotice a plasmii sanguine, factori implicați în intrarea sau ieșirea apei din celule.

Tabel 4

Modificarea parametrilor eritrocitari prin testarea in vitro a biomaterialului S2 (MoNbTaTiZr) imersat în sânge total de cal (T1 – tub test martor; T2 – tub test cu material nepolișat; T3 – tub test cu material polișat)

Parametri eritrocitari	Limite de referință cal*	Biomaterial S2 – MoNbTaTiZr		
		T1	T2 (T2-T1)	T3 (T3-T1)
RBC ($\times 10^6/\mu\text{l}$)	6,8-12,9	6,82	6,42 (-0,40)	6,60 (-0,22)
HCT (%)	32-53	32,30	30,73 (-1,47)	31,63 (-0,67)
HGB (g/dl)	11-19	11,2	10,7 (-0,5)	11,0 (-0,1)
VEM (fl)	37-59	47,4	47,9 (+0,5)	47,9 (+0,5)
CHEM (g/dl)	31-39	34,67	34,81 (+0,14)	34,77 (+0,1)

* analizator hematologic automat VetScan HN5

RBC – red blood cells (număr de eritrocite); HCT – hematocrit (procent masă eritocitară din total sânge); HGB – cantitatea de hemoglobină din sânge total; VEM – volumul eritocitar mediu; CHEM – concentrația în hemoglobină eritocitară medie

Aliajul S2 cu conținut în Mo și Nb, determină scăderea corelată a eritrocitelor, hematocritului și hemoglobinei sângelui total, fără a determina modificări ale VEM-ului și CHEM-ului. Aceste modificări in vitro se pot explica numai prin creșterea agregabilității celulare și excluderea de la numărare celulară a elementelor agregate. Aceste aspecte sunt bine evidențiate în frotiurile de sânge efectuate din tuburile test (fig.2).

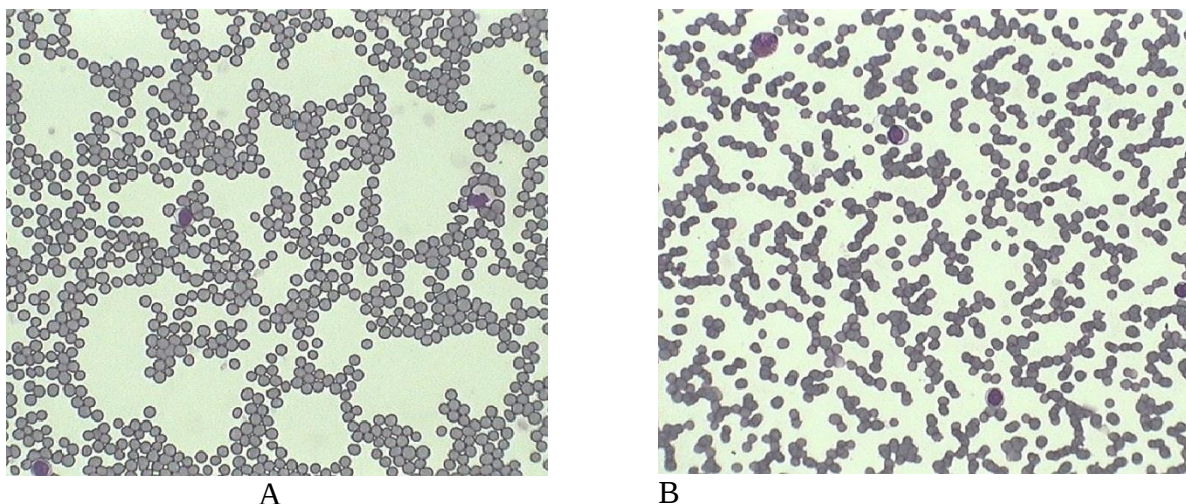


Fig.2. Agregabilitate eritrocitară in vitro. Sange cal. (DQ, x 400). A. Tub test T1 – martor; B. Tub test T2 aliaj S1 (FeMoTaTiZr).

Este cunoscut faptul că CHEM-ul este indicator al hemolizei intravasculare in vivo sau al hemolizei probei de sânge in vitro. In prezentul studiu, diferența dintre CHEM-ul în tubul test cu aliajul de testat (T2 sau T3) și tubul test martor (T1), ar putea fi propusă ca indice hemolitic. Conform ASTM F 756-00 (2000), materialele se pot clasifica în 3 categorii: hemolitice cu indice hemolitic peste 5, ușor hemolitice, cu indice hemolitic între 2 și 5, și non-hemolitice cu indice hemolitic sub 2. Studiul de față a relevat valori ale indicelui hemolitic sub 2, cu diferențe nesemnificative între cele două materiale testate in vitro pe sânge animal.

Agregabilitatea celulară se evidențiază nu doar în cazul eritrocitelor, ci și în cazul celulelor sanguine albe, dar mai ales în cazul plachetelor sanguine, care prin aderarea și agregare la peretele vascular lezionat contribuie permanent la reparația microleziunilor vasculare.

În tabelele 5, 6, 7 și 8 se evidențiază modificările privind numărul plachetelor sanguine (PLT), a celulelor albe totale (WBC – white blood cells), precum și procentul de leucocite diferențiate (polimorfonucleare, monocite și limfocite) determinate de contactul direct cu sângele total de câine și cal al aliajelor studiate.

Analizând rezultatele obținute, se constată că plachetele sanguine se reduc semnificativ atât în cazul biomaterialului S1, cât și a biomaterialului S2, efectul de aderare și agregare la suprafața rugoasă a acestora fiind mai bine relevat la sângele de cal, plachetele dispărând complet din sângele analizat. De asemenea, efectul proagregant plachetar este mai evident la biomaterialul S1, ce are în compoziție Fe și Mo. Aceste aspecte s-au evidențiat și în frotiurile de sânge (fig.3).

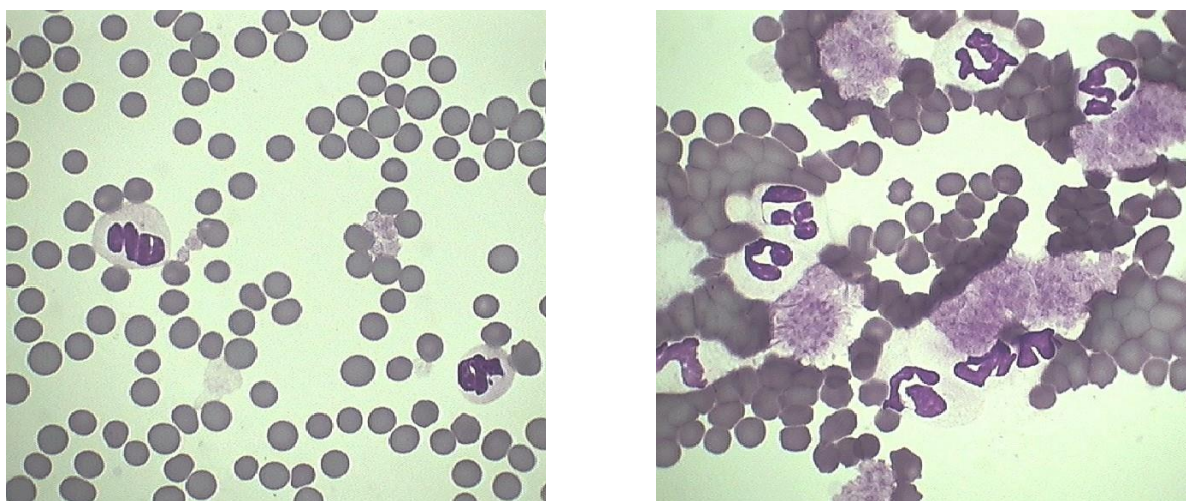


Fig.3. Agregabilitate plachetară in vitro. Sange cal. (DQ, x 1000). A. Tub test T1 – martor – rare agregate plachetare mici; B. Tub test T2 aliaj S1 (FeMoTaTiZr). Numeroase agregate plachetare mari.

Tabel 5

Modificarea numărului plachetelor și leucocitelor prin testarea in vitro a biomaterialului S1 (FeMoTaTiZr) imersat în sânge total de câine (T1 – tub test martor; T2 – tub test cu material nepolișat; T3 – tub test cu material polișat)

Parametri sanguini	Limite de referință câine *	Biomaterial S1 - FeMoTaTiZr		
		T1	T2	T3
PLT ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	165-500	58	17	29
WBC ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	6,0-17,0	11,95	11,72	11,30
PMN (%)	62-88	39,8	52,0	38,8
Mo (%)	3-10	3,0	0,4	0,4
Lf (%)	12-30	57,2	47,6	60,7
Rap.PMN/Lf	-	0,69	1,09	0,63

* analizator hematologic automat VetScan HN5; The Merck Veterinary Manual, Eight Ed.

PLT – plachete sanguine; WBC – white blood cells (număr de leucocite totale); PMN – leucocite polimorfonucleare; Mo – monocite; Lf – limfocite.

Agregatele leucocitare, datorate contactului cu biomaterialele studiate au indus în sângele examinat modificări diferite. Astfel, la sângele de câine, s-a evidențiat diminuarea procentului de mononucleare (Mo și Lf), în cazul materialului rugos S1, ceea ce explică o activare și acumulare focală a acestor elemente din seria leucocitară, fiind astfel excluse de la numărătoarea automată (tabel 5). Materialul S2 a generat în sângele de câine reducerea polimorfonuclearelor și a monocitelor, acestea fiind incluse în procesul de agregare și acumulare focală.

Aderența și agregarea elementelor celulare ale seriei leucocitare, care echivalează cu fenomenul de acumulare focală din procesul inflamator, s-a evidențiat net în cazul ambelor biomateriale în contact cu sângele de cal (fiind redus numărul de leucocite totale pe seama polimorfonuclearelor, de la 60,7 % la 47,3 % (S1), respectiv 48,7 % (S2) în cazul materialului rugos (tub test T2) și doar la 54,2 % (S1 și S2), în cazul materialului polișat (tub test T3) (tabel 7 și 8). Aspectele de agregare leucocitară (Nf, Eo) sunt evidențiate și în frotiurile sanguine (fig.4).

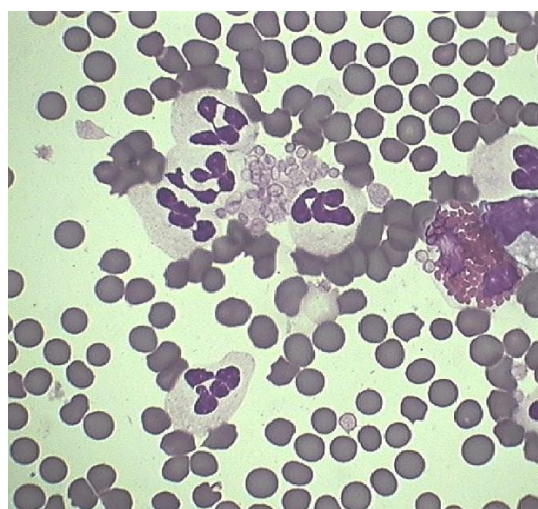
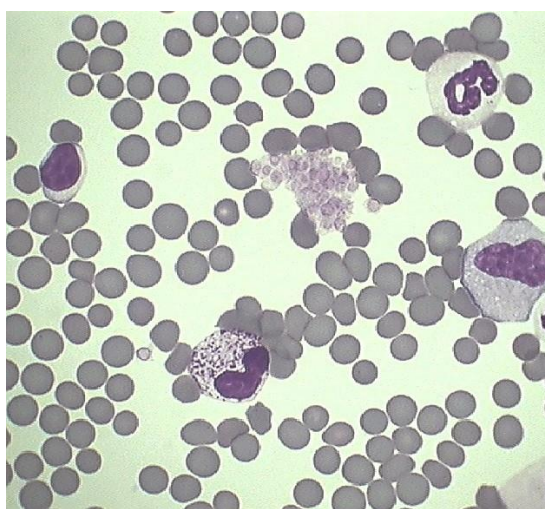


Fig.2. Agregabilitate leucocitară in vitro. Sange cal. (DQ, x 1000). A. Tub test T1 – martor – Leucocite neagregate; B. Tub test T2 aliaj S2 (MoNbTaTiZr). Agregate leucocitare (Nf, Eo) și satelitism plachetar.

Actualmente există numeroase studii referitoare la activarea, aderarea și agregarea in vitro celulelor sanguine (mai ales a plachetelor sanguine) sau tisulare (mai ales a macrofagelor) în prezența materialelor străine de organism, cu precadere a celor cu suprafață rugoasă. Studiul nostru aduce informații suplimentare referitoare la reactivitatea diferită a sistemului leucocitar din sângele de câine și cal, relevat prin modificarea raportul PMN/Lf, la contactul sângelui respectiv cu biomaterialele testate. Astfel, raportul supraunitar, obișnuit întâlnit la sângele de câine și cal (1,59-2,47), devine aproape unitar (0,94-0,98) în cazul probelor cu suprafață rugoasă, dar înregistrează o ușoară reducere (1,21 – 1,76) în cazul probelor cu suprafață netedă, în ambele situații fiind vorba de recrutarea PMN la contactul cu materialul străin. Doar într-o singură situație s-a produs activarea mononuclearelor, acestea fiind în mod atipic excedentare în sângele de câine în care s-a testat biomaterialul S1 rugos, raportul PMN/Lf crescând de la 0,69 la 1,09.

3.1. Rezultatele testelor de coagulabilitate sanguină

Coagularea sângelui constituie etapa secundară a hemostazei fiziologice, care se produce imediat după aderarea și agregarea plachetelor sanguine la buzele plăgii vasculare, ce constituie prima etapă de stopare a pierderilor sanguine din vasele lezionate. În general, orice suprafață rugoasă (plaga vasculară sau corp străin) generează activarea sistemului de coagulare sanguină pe două căi: calea extrinsecă și calea intrinsecă, ce reprezintă două mijloace diferite de generare din proteinele plasmatică inactive (profactori ai coagulării) a unor activatori ai protrombinei, cunoscuți sub denumirea generică de tromboplastină plasmatică. Protrombina (factorul II) se transformă în trombină activă, iar aceasta transformă fibrinogenul solubil (factorul I) în fibrină insolubilă, care macroscopic reprezintă coagulul plasmatic care închide definitiv plaga vasculară. Calea extrinsecă a coagulării se poate verifica prin determinarea timpului de protrombină (TP) care evidențiază implicarea unui set de factori activați de un fosfolipid tisular, în timp ce calea intrinsecă se verifică prin timpul de tromboplastină activat (TTPA) care evidențiază implicarea unui alt set de factori proteici din plasmă ce se activează prin contact cu o suprafață rugoasă. De asemenea, calea comună finală poate fi verificată prin dozarea fibrinogenului plasmatic (FBN), acesta având rol dublu – în hemostază și în procesul inflamator, fiind considerat un marker de fază acută a inflamației.

În prezentul studiu, înainte și după contactul sângelui de cal cu biomaterialele S1 și S2, s-au determinat TP, TTPA și FBN.

Din analiza rezultatelor obținute se evidențiază o scurtare a TTPA și o reducere a concentrației fibrinogenului plasmatic. Aceasta dovedește efectul procoagulant al biomaterialelor testate prin activarea căii intrinseci a procesului de coagulare, ce implică activarea de contact, cu accelerarea reacțiilor în cascadă implicate în transformarea fibrinogenului (chiar și ușor redus cantitativ prin adsorbție la suprafața biomaterialelor) în fibrină.

Concluzii

1. Biomaterialele cu entropie ridicată (S1 – FeMoTaTiZr și S2 – MoNbTaTiZr) testate in vitro în contact cu sângele animal (câine și cal) prezintă diferențe de comportament în privința hemocompatibilității, în funcție de aspectul suprafeței de contact (rugoasă sau netedă) și compoziția biomaterialului.

2. Testul de hemoliză in vitro efectuat pe cele două aliaje (S1 și S2) încadrează biomaterialele testate ca non-hemolitice, dar cu un grad de hemoliză mai accentuat în cazul imersării atât în sângele de cal, cât și în sângele de câine a biomaterialului S1 cu suprafață rugoasă. Biomaterialul S2 determină, în schimb un efect agregant eritrocitar mai accentuat decât biomaterialul S1, aspect reflectat în modificarea proporțională a tuturor indicilor eritrocitari.

3. Testul de agregabilitate plachetară reflectat in vitro prin diminuarea numărului de plachete sanguine în urma contactului direct cu sângele animal al biomaterialelor testate indică un efect

puternic trombogen al acestora, indiferent de compoziția acestora, mai accentuat în cazul materialelor cu suprafață rugoasă.

4. Testarea efectului de acumulare focală (în jurul materialului străin) a celulelor cu funcție imunitară și activarea acestora in vitro în prezența biomaterialelor S1 și S2 a evidențiat stimularea activării și acumulării focale a polimorfonuclearelor, proces intensificat de suprafața rugoasă a ambelor materiale.

5. Testele de coagulare efectuate din plasma sanguină menținută în contact cu biomaterialele studiate, au relevat un efect minim procoagulant prin activarea factorilor de coagulare ai căii intrinseci, cunoscuți ca factori de contact.

Testarea biocompatibilității in vivo a noilor aliaje cu entropie ridicată (FeMoTaTiZr, MoNbTaTiZr)

Materiale și metode

2.1. Pregătirea implanturilor

Materialele cu entropie ridicată au fost preparate în cadrul Universității Tehnice București având următoarea compoziție chimică:

- **Produsul HEA-1:** MoNbTaTiZr - (Mo=17,32%; Nb=13,07%; Ta=38,95%; Ti = 13,21%; Zr=17,45%) (%masice).
- **Produsul HEA-2:** FeMoTaTiZr - (Fe = 15,46%; Mo=20,45%; Ta=32,45%; Ti = 12,67%; Zr=18,97%) (%masice);

Din lingourile pregătite s-au taiat bucăți mici de material, cu diam de 0,5-1,00 cm diametru și grosime de 1-2 mm, care au fost polisate pentru a reduce efectul de suprafață rugoasă (fig.1).

Pieseile astfel obținute, au fost spălate cu apă bidistilată de 5 ori, apoi degresate cu acetonă 30 minute și sterilizate prin fierbere timp de 1 oră.

2.2. Protocolul experimental

S-a utilizat în experiment un număr de 18 șobolani, masculi, în vârstă de 10-15 luni (169-470 kg), care au fost grupați în 3 loturi, a câte 6 indivizi, după cum urmează: un lot martor (M), subîmpărțit în martor negativ (fără implant) - MN și martor pozitiv (cu implant, o tijă cilindrică de inox standard) - MP; un lot experimental LI la care s-a utilizat materialul HEA 1 – MoNbTaTiZr, subîmpărțit în lot L1-A cu implant subcutanat și lot LI- B cu implant osos; un lot experimental LII la care s-a utilizat materialul HEA 2 – FeMoTaTiZr, subîmpărțit la rândul său în LII- A – implant subcutanat și LII-B implant osos. Etapele experimentului au fost: T0 – ziua implantului; T1 – o săptămână postimplant; T2 – 1,5 luni postimplant; T3 2 luni postimplant și T4 - 3,5 luni postimplant. La o săptămână postimplant (momentul T1) s-a efectuat examen radiologic, iar la 2 luni (momentul T3) și 3,5 luni postimplant (momentul T4) s-au efectuat în plus computer tomograf (CT) și prelevare de probe histologice, în vederea evaluării biocompatibilității și osteointegrării. În fiecare etapă a experimentului s-a efectuat cântărirea animalelor și recoltarea probelor de sânge pentru a evalua reacțiile inflamatorii sistemice.

Toate experimentele de implant la șobolani au fost aprobate de Comitetul de Etică al Facultății de Medicină Veterinară din Iași.

Implantul intraosos:

După pregătirea implanturilor prin sterilizare în etuvă (160 grade Celsius, 50 min) (Fig.2.1), șobolanii au fost aneșteziați cu xilazină 2 mg/kg și ketamină 10 mg/kg. Câmpul operator a fost pregătit prin tundere și dezinfecție cu betadină.

S-a realizat o incizie de 1 cm la nivelul crestei tibiale ce a interesat pielea și țesutul conjunctiv subcutanat, apoi cu un burghiu special s-a forat un orificiu în creasta tibială în care am

introdus implantul pe canalul medular. Plaga cutanată a fost suturată cu nylon în fire separate, care au fost îndepărtate după 10 zile (Fig.2.2, A-F).

Implant subcutanat:

Câmpul operator a fost pregătit prin tundere și dezinfecție cu betadină. Cu bisturiul s-a realizat o incizie de 1 cm pe latura stânga a toracelui, în treimea mijlocie. Cu vârful unei forfecuțe s-a dilacerat țesutul conjunctiv subcutant, iar în buzunarul creat s-a introdus implantul. Plaga operatorie s-a suturat cu nylon în fire separate care au fost îndepărtate după 10 zile

În primele 2 săptămâni postimplant, șobolanii au primit zilnic caprofen 200 mg/kg pentru a limita durerea.

La momentele T3 (2 luni postimplant) și T4 (3,5 luni postimplant) șobolanii au fost eutanasiați. La finalizarea experimentului, prevăzut "ca fiind fără recuperarea animalelor" conform Legii 43/2014, eutanasierea animalelor s-a efectuat cu T 61 în doză de 1ml/individ administrat intrapulmonar. În urma eutanasierii s-au recuperat implanturile și s-au prelevat probe de țesut cutanat și osos, care ulterior au fost procesate pentru examen histologic.

2.4. Examenul imagistic (Rx și CT)

Imaginile radiologice s-au realizat cu aparatul de radiologie model Intermedical basic 4006, an producție 2009. Plăcile detectoare utilizate au avut dimensiunea de 24x30 cm. Developarea s-a realizat digital, cu aparatul Examion X-CR Smart. Subiecții au fost examinați prin imagine dorso-ventrală pentru implanturile subcutanate și decubit lateral, incidență medio-laterală de membru posterior pentru implanturile la nivel tibial. Pentru expunere s-au utilizat setările de 46 kV (kilovolți) și 1.3 mAs (miliamperi/secundă).

Pentru a evalua microstructura zonelor de implant s-a utilizat un sistem CT de mare rezoluție (Siemens Somatom, Balance, Germany) – rezoluția 20 μ /slice.

2.5. Examenul histologic

Probele de piele și os au fost fixate cu formaldehida 4%, deshidratate în alcool de concentrații crescânde: 70%, 80%, 90%, 96%, 100%, 24 de ore fiecare, apoi au fost clarificate, incluse la parafină, secționate cu microtomul la dimensiunea de 5 μ m, colorate HE, HEA și microfotografiate cu microscopul Leica.

2.6. Examenul hematologic

Pentru a evidenția reacțiile inflamatorii sistemice posibile s-au efectuat frotiuri de sânge de la fiecare animal: picatura de sânge prelevată din vena caudală s-a etalat pe lamă, frotiul s-a uscat rapid la aer, apoi s-a colorat prin una din tehnicile Romanowsky (MGG sau DQ) și a fost examinat microscopic de către doi examinatori independenți care au cuantificat leucocitele diferențiate. În plus, s-a recoltat 1 ml sânge pe EDTA pentru determinarea leucocitelor totale (WBC) și a hematocritului (Fig.2.4).



Fig.2.4. Recoltarea sângelui din venele caudale la șobolan.

3. Rezultate obținute

3.1. Rezultatele examenului imagistic (Rx și CT)

Imaginile examenului radiologic și CT la șobolanii din lotul martor și cele două loturi experimentale cu implant din biomateriale HEA se prezintă în figurile 3.1-3.12.

Șobolanii din lotul martor negativ (fără implant) prezintă un aspect normal al densității și mineralizării osoase și absența modificării țesutului subcutanat (fig.3.1. A și B). Implantul standard cu tijă metalică s-a efectuat atât subcutanat, cât și intraosos la șobolanii din lotul martor pozitiv, fără a observa modificări radiografice și tomografice considerabile în țesuturile moi și periostale, pe toată durata experimentului (fig.3.2 și 3.3).

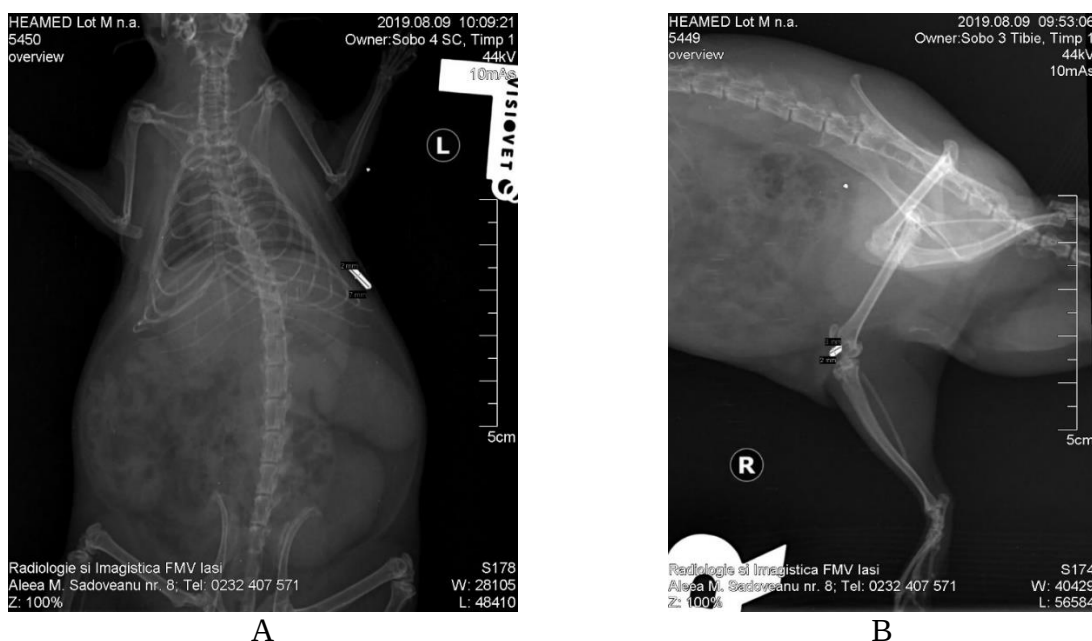


Fig.3.2. Martor pozitiv – implant tijă metalică standard, 7 zile postimplant. A. Sobolan M1, cu implant subcutanat. Imagine radiologică de torace și abdomen, vedere dorso-ventrală – la nivelul peretelui toracic stâng, în zona subcutanată se observă implantul cu radioopacitate de corp metalic, cu dimensiune de 2 x 7 mm, cu margini netede, fără prezența reacției țesuturilor moi ce înconjoară implantul. **B. Șobolan M3, cu implant osos.** Imagine radiologică de membru drept posterior, vedere medio-laterală – la nivelul trohleei femurale; se observă implantul cu radioopacitate de corp metalic, cu dimensiune de 2 x 3 mm, cu margini netede, fără reacție intraosoasă, articulară sau periostală.

Șobolanii din lotul experimental LI, cu noul implant HEA-1 ((MoNbTaTiZr), introdus chirurgical subcutanat și intraosos, au prezentat modificări minime periimplant pe durata celor 3,5 luni de menținere a implantului. La 1 săptămână postimplant se remarcă, atât în cazul implantului inserat subcutanat, cât și al celui intraosos, o zonă redusă de radiotransparență, compatibilă cu emfizemul subcutanat sau cu pierderea de substanță osoasă cauzată de intervenția chirurgicală (fig.3.4 A și B).



A



B

Fig.3.4. Șobolani LI, 1 săptămână postimplant HEA-1 (MoNbTaTiZr). A. Șobolan LI-2: imagine radiologică de torace și abdomen, vedere dorso-ventrală – la nivelul peretelui toracic stâng, în zona subcutanată se observă implantul cu radioopacitate de corp metalic, cu dimensiune de 3 x 6mm, cu margini netede, fără prezența reacției țesuturilor moi ce înconjoară implantul. Cranial implantului se observă o linie de radiotransparență subcutanată compatibilă cu emfizemul subcutanat. B. Șobolan LI-4 Imagine radiologică de membru drept posterior, vedere medio-laterală – la nivelul crestei tibiale se observă implantul cu radioopacitate de corp metalic, cu dimensiune de 2 x 8 mm, cu aspect conic, cu margini netede. Nu prezintă reacție osoasă la marginea implantului. Se observă o zonă de radiotransparență la marginea dorso-cranială a crestei tibiale compatibilă cu pierderea substratului osos post-implantare.



Fig.3.5. Șobolan LI-2, 2 luni postimplant s.c., biomaterial HEA-1 (MoNbTaTiZr). A. Imagine radiologică de torace și abdomen, vedere dorso-ventrală – la nivelul peretelui toracic stâng,

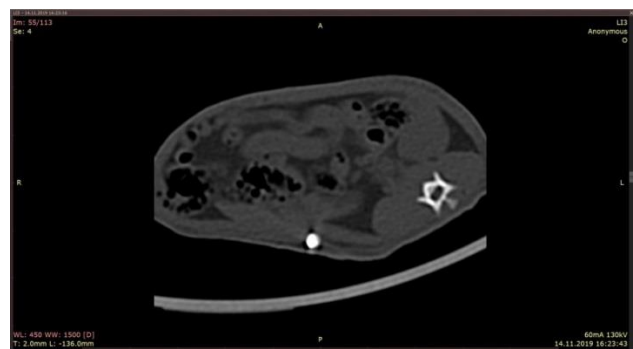
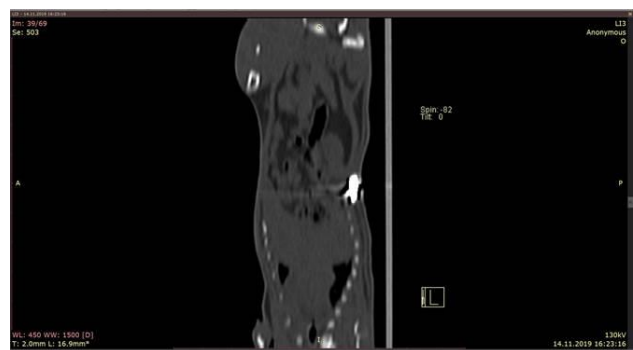
se observa implantul cu radioopacitate de corp metalic, de 3 x 6mm, cu margini netede, fără prezența reacției țesuturilor moi periimplant. B. Imagine CT dorsală (sus) și transversală (jos): implant metalic plasat subcutanat laterotoracic stâng; nu se constata aspect infiltrativ al țesutului subcutanat și nici emfizem subcutanat.

După 2 luni de menținere a implantului s.c. HEA-1, nu se observă reacția țesuturilor moi periimplant, nu apare infiltrația țesutului conjunctiv subcutanat și nici emfizem subcutanat (fig. 3.5), în schimb apare o calusare a canalului osos de impalntare și aspectul îngroșat al corticalei osoase, fără demineralizare (fig.3.6).

La 3,5 luni de menținere a implantului HEA-1 (MoNbTaTiZr), examenul radiologic și examenul CT nu relevă modificări semnificative în țesutul subcutanat (fig.3.7 A și B), dar evidențiază moderată creștere a radiotransparenței (fig.3.8 A) și creșterea grosimii corticalei osoase (fig.3.8 B), modificări compatibile cu reactivitatea osoasă.



A



B

Fig.3.7. Șobolan LI-3, la 3,5 luni postimplant, biomaterial HEA-1 (MoNbTaTiZr). A. Imagine radiologică de torace și abdomen, vedere dorso-ventrală – la nivelul peretelui toracic stâng, în zona subcutanată se observa implantul cu radioopacitate de corp metalic, cu aspect dreptunghiular, cu dimensiune de 3 x 6 mm, cu margini netede; nu se observă reacție a țesutului subcutanat în zona implantului. B. Imagine CT în plan dorsal și transversal: implant metalic subcutanat, inferior de rebordul costal stâng; nu se constata modificări semnificative în țesutul subcutanat.

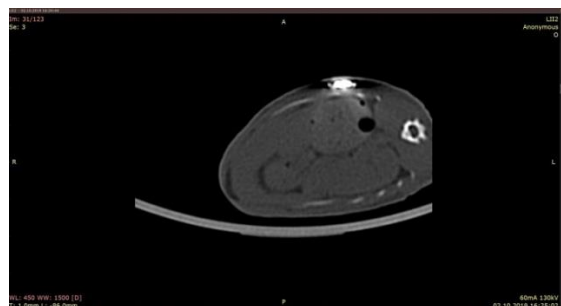
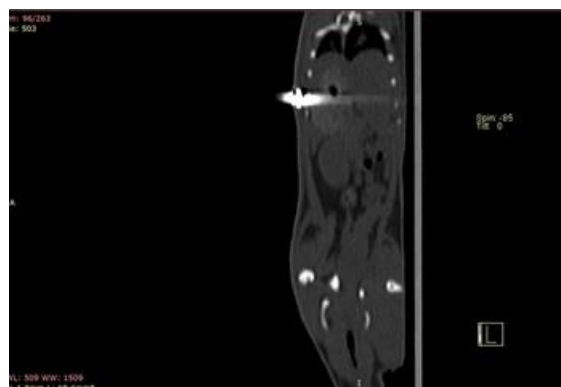
Șobolanii din lotul experimental LII, cu noul implant HEA-2 (FeMoTaTiZr), au prezentat câteva modificări pe parcursul celor 3,5 luni de menținere a implantului.

La o săptămână postimplant, examenul radiologic a evidențiat doar pierdere de substrat osos. Nici după 2 luni de la implantarea biomaterialului HEA-2 nu s-au constatat modificări radiologice și tomografice de reactivitate osoasă, ci doar radiotransparență (compatibilă cu pierderea de substrat osos) la marginea dorso-cranială a crestei tibiale.

În zona implantului subcutanat, tumefacția moderată observată după 2 luni de la implantare (fig.3.11 A) diminuează până la dispariție după 3,5 luni.



A



B

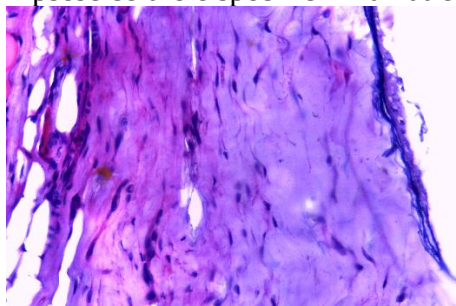
Fig. 3.11. Șobolan II-2, la 2 luni postimplant, biomaterial HEA-2 (FeMoTaTiZr). A. Imagine radiologică de torace și abdomen, vedere dorso-ventrală; la nivelul peretelui toracic stâng, s.c., se observă implantul cu radioopacitate de corp metalic, cu aspect triunghiular, ascuțit, cu dimensiune de 2x5 mm, cu margini netede; se observă moderată tumefacție a țesutului subcutanat în zona implantului. B. Imagine CT dorsală (sus) și transversală (jos): implant metalic plasat subcutanat laterotoracic stâng; nu se constata aspect infiltrativ al tesutului subcutanat si nici emfizem subcutanat.

3.2. Rezultatele examenului histologic

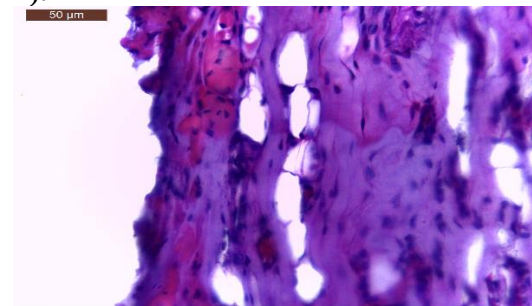
La lotul martor negativ, fara implant nu s-au inregistrat modificari la nivelul pielii și țesutului osos.

Pielea este formata din epiderm, derm (fig.1a). Epiteliu pavimentos stratificat cheratinizat prezinta 2-3 straturi de cellule si un strat cornos care are un diametru variabil . In derm se evidentiaza un strat format din fibre de collagen, elastic, cellule conjunctive, vase sanguine, filete nervoase, glande sebacee in vecinatatea foliculilor pilosi.

La martorul pozitiv, M1, cu tijă standard subcutanat (sc), pielea prezintă modificări reprezentate de o densificare conjunctivă peri-implant și o atrofie a epidermului, o creștere a glicozaminoglicanilor in derm (fig. 3.14 A). Zona peri-implant este formata din țesut conjunctiv dens format din fibre de collagen, cellule conjunctive, mezenchimale proliferate, glicozaminoglicani, vase sanguine. Lipsesc celulele specific inflamatiei (fig. 3.14 B).



A



B

Fig. 3.14. M1 – tijă standard subcutanat. A. Modificari ale pielii sunt reprezentate de o densificare conjunctiva peri-implant si o atrofie a epidermului, edem al dermului. B. Zona peri-implant este formată din țesut conjunctiv dens și celule conjunctive, mezenchimale proliferate, vase sanguine. Lipsesc celulele specific inflamatiei. Col HEx200 x400.

La martorul M3 – tijă standard, implant osos, zona periostului este formata dintr-un țesut conjunctiv dens, format din fibre conjunctive și în zona interioara se disting celule stem mezenchimale care se continua și în spațiul intrerabecular redus (fig 3.15A). Țesutul osos nou format în proporție redusa se continua cu osteoane. Zona peri-implant este reprezentata de o capsula densa, conjunctivă care se continuă cu os trabecular.

Țesutul osos provenit de la lotul martor, fara implant, are aspect normal. Zona periostului, densă se continuă cu un strat subțire de celule stem mezenchimle, osteoane mici (fig 3.16A). Endostul este format din lamele osoase între care apar linii de mineralizare, caracteristice remodelarii osoase (fig. 3.16B).

La șobolanii din lotul I cu implant HEA-1 sc hemitorace stâng, pielea din zona implantului prezintă modificări nesemnificative. Epiderma are un număr variabil de 2-5 straturi celulare; în derm se evidențiază foliculi piloși nemodificați, cu glande sebacee adiacente (fig. 3.17A). In zona periimplant remarcăm o teacă subțire formată din aglomerări de fibre de collagen, glicozaminoglicani, celule conjunctive, fără celule de tip inflamator (fig. 3.17B).

La LI-3, pielea prezintă un edem redus al dermului, o proliferare a tecilor foliculilor piloși din vecinătatea implantului (fig. 3.18A). Zona peri-implant este reprezentată de o teacă densă formată din fascicule de fibre de collagen (fig. 3.18B). In vecinătatea acesteia se observă o proliferare a celulelor mezechimale care se diferențiază în celule secretoare de glicozaminoglicani. In această zonă se pot observa și un număr mare de capilare sanguine (fig 3.18C). Nu sunt prezente celule specifice procesului inflamator.

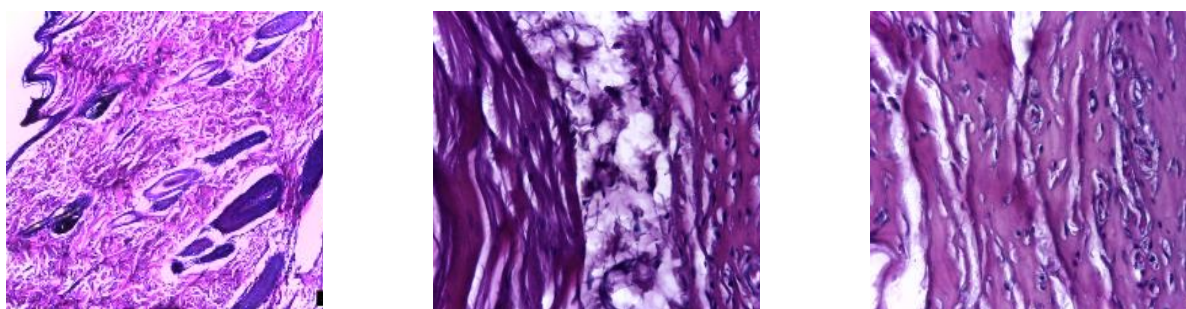


Fig. 3.18. LI-3 implant sc hemitorace stâng. A. Pielea în zona implantului prezintă un edem redus al dermului, o proliferare a tecilor foliculilor piloși din vecinătatea implantului. B. Zona peri-implant este reprezentată de o teacă densă de collagen. In vecinătatea acesteia se observă o proliferare a celulelor mezechimale care se diferențiază în celule secretoare ale matricii extracelulare și un numar mare de capilare sanguine. Col HE x100 (A); x400 (B,C).

La șobolanii din lotul I cu implant HEA-1 în creasta tibială a membrului posterior drept, zona periostului este foarte vascularizata; se pot observa capilare, un număr mare de celule mezenchimale diferențiate în osteoblaste implicate în formarea țesutului osos nou, trabecular, prin osificare desmală (fig.3.19A). In zona peri-implant remarcăm țesut cartilaginos redus care se continuă cu osul nou format in procesul de osificare endocondrală (fig. 3.19B). De asemenea sunt caracteristice si zonele de remodelare cu linii de mineralizare (fig. 3.20A). In zona peri-implant apar zone de os nou format de tip trabecular aflat in proces de remodelare (fig 3.20B).

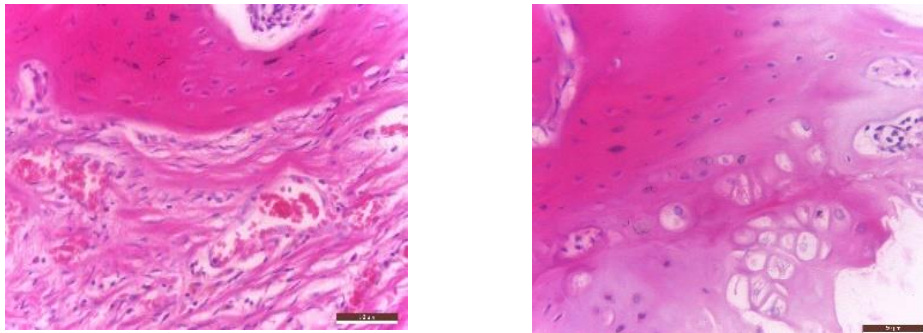


Fig. 3.19. L1-1 implant creastă tibială dr. A. Zona periostului este foarte vascularizată, cu un număr mare de celule mezenchimale diferențiate în osteoblaste implicate în formarea țesutului osos nou, trabecular. B. In zona peri-implant se observă procesul de osificare endocondrală. Col. HE x400

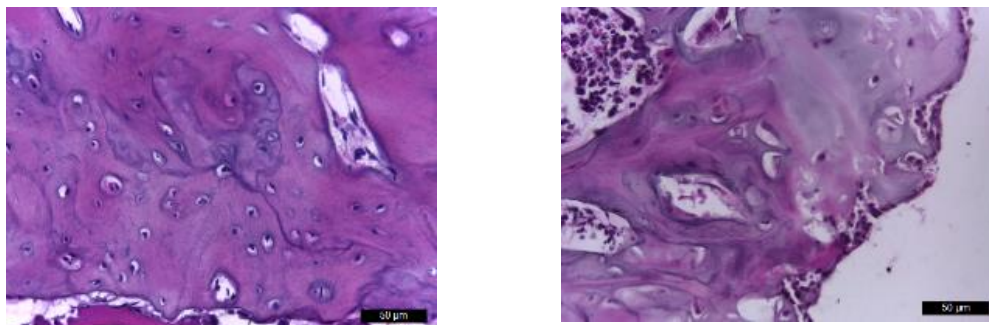


Fig. 3.20. L1-4 implant creastă tibială dr. A. In zona periostului apare un număr mic de celule mezenchimale. Periostul se continuă cu osteane mici, nou formate, zone de remodelare și linii de mineralizare caracteristice. B. In zona peri-implant apar zone de os nou format de tip trabecular aflat in proces de remodelare. Col HE x400.

La șobolanii din lotul II cu implant HEA-2 sc în hemitorace stâng, pielea prezintă modificări atât la nivelul epidermului, dermului cât și zonei peri-implant sau chiar la distanță. Epiderma prezintă 1-2 randuri de celule, la nivelul dermului remarcăm glicozoaminoglicani (3.21A). In zona peri-implant se evidențiază o teacă groasă conjunctivă formată din fibre de colagen, celule conjunctive și glicozoaminoglicani (fig. 3.21B). Nu apar celule implicate în procese inflamatorii. De asemenea, apar și zone de atrofie a epidermului, cu acumulare concomitentă de glicozaminoglicani (fig.3.22A), ca și fibre de colagen și celule conjunctive (fig.3.22B).

In unele cazuri se formează în jurul implantului o adevărată capsulă fibroasă (fig.3.23 A), sunt prezente celule conjunctive atât periimplant cât și la distanță, implicate în sinteza de glicozaminoglicani (fig.3.23B). In plus, s-a observat depunerea materialului bazofil, indicând formarea de particule minerale și osteoid caracteristic (fig. 3.23C)

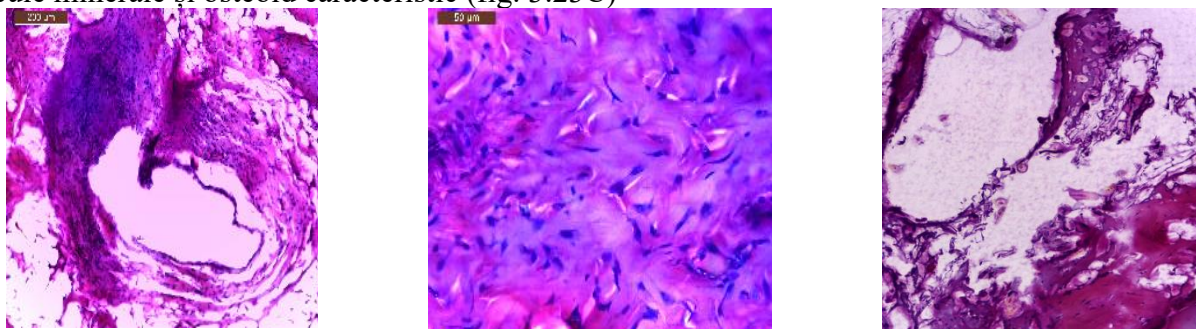


Fig 23. Șobolan LII-4, implant sc cu HEA-2: A. Capsulă fibroasă în jurul implantului. B. Zona peri-implant dar și la distanță formată din aglomerări de cellule conjunctive implicate in sinteza

glicozaminoglicanilor. C. Depunere de material bazofil, care indică formarea de particule minerale și țesut osteoid. Col HE x100 (A); x400(B); x200 (C).

La șobolanii din lotul II cu implant Hea-2 în creasta tibială a membrului posterior drept, în zona din vecinătatea implantului s-au evidențiat aglomerări de osteoblaste diferențiate din celulele mezenchimale situate în spațiul intertrabecular. Aceste celule sunt implicate în procesul de osteogeneza (fig. 24A). În zona peri-implant se observa osificare pe model membranos (fig 24B).

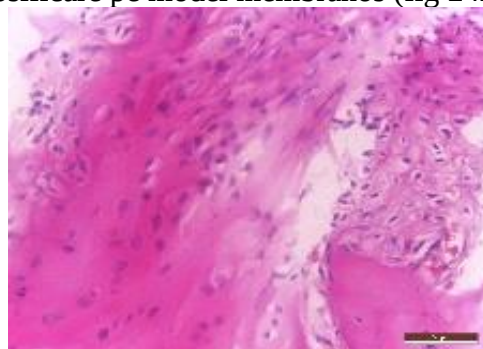
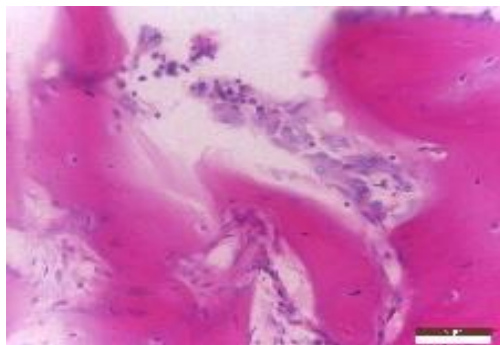


Fig. 24. LII-3 implant HEA-2, creastă tibială dr. A. Osul din vecinătatea implantului prezintă aglomerări de osteoblaste diferențiate din celulele mezenchimale situate în spațiul intertrabecular. B. În zona peri-implant se desfășoară procesul de osificare pe model membranos. Col HE x400.

Cu toate acestea, în acest studiu, nu s-a observat formarea osului ectopic. Astfel, în lucrarea de față, osul autogen nu poate fi luat în considerare ca un osteoinductor.

3.3. Rezultatul examenului hematologic

Rezultatele indicatorilor hematologici determinați pentru a surprinde starea de hidratare a animalelor pe parcursul experimentului, precum și statusul imun și reactivitatea inflamatorie în prezența implanturilor subcutanate și intraosoase cu noile materiale HEA (high entropy alloys) testate sunt raportate atât la valorile medii ale martorilor negativi și pozitivi, cât și la valorile de referință pentru șobolani adulți cu vârsta cuprinsă între 12 – 15 luni (tabel 3.1 și 3.2).

Hematocritul (%), indicator al hidratării organismului și un test screening pentru diagnosticul anemiei, a înregistrat la animalele testate valori medii ușor mai mici decât cele de referință. Martorul negativ a evidențiat pe parcursul experimentului mici variații nesemnificative, o creștere mai evidentă, datorată deshidratării, fiind observată în prima săptămână, când animalele s-au adaptat noilor condiții de cazare, hrănire și adăpare. Martorul pozitiv a relevat doar în prima săptămână postimplant o diminuare a valorii medii a hematocritului cauzată de o pierdere a globulelor roșii ca urmare a intervenției chirurgicale de implantare.

Animalele din loturile experimentale pentru testarea noilor materiale HEA au avut modificări comparabile cu ale lotului martor pozitiv (cu implant metalic standard). În plus, diminuarea hematocritului a continuat pe toată durata menținerii implantului, fără revenire completă la valoarea din momentul T0 (preimplant) (fig.3.25). Se remarcă o scădere graduală a valorilor hematocritului pentru indivizii lotului L1 (implant HEA-1), cu tendință spre anemie. Acțiunea citopenică asupra celulelor din seria eritocitară este mai accentuată în cazul biomaterialului HEA- 1 (MoNbTaTiZr), dar rămâne în discuție și necesită aprofundarea investigațiilor la nivelul măduvei osoase hematogene.

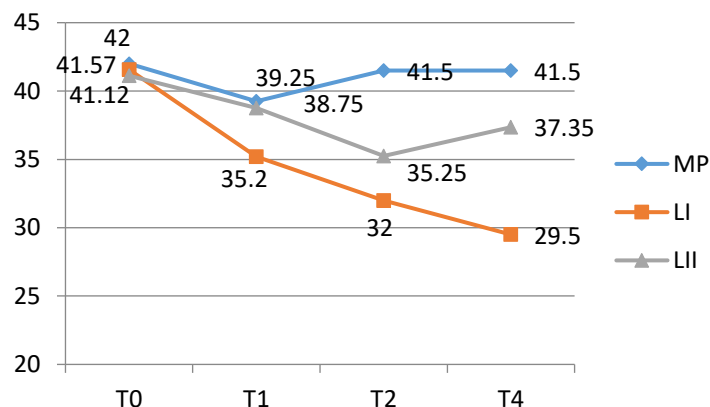


Fig.3.25. Dinamica modificării hematocritului (%) la loturile de șobolani cu implant HEA- 1 (LI) și HEA-2 (LII), comparativ cu lotul Martor pozitiv (implant standard) – MP. T0 – preimplant; T1 – 1 săptămână postimplant; T2 – 1,5 luni postimplant; T4 3,5 luni postimplant

Seria leucocitară a vizat determinarea numărului total de leucocite circulante (WBC – white blood cells) și aprecierea formulei leucocitare cu identificarea variațiilor raportului Nf/L. (tabel 3.2).

Raportul Nf/Lf constituie un indicator important în decelarea proceselor inflamatorii. La șobolanii din lotul martor s-au observat variații ale raportului Nf/Lf în sens invers la martorul pozitiv față de cel negativ în momentul T1, dar în ansamblu, valorile s-au menținut relativ constante, în următoarele etape ale experimentului. Șobolanii din loturile LI și LII au manifestat o scădere graduală a raportului Nf/Lf relevând caracterul agresiv al utilizării implanturilor experimentale, cu stimularea sistemului celular al imunității, diferența dintre cele două loturi fiind dată de o creștere a aceluiași raport la indivizii din lotul LI spre finalul experimentului fapt ce poate fi asociat cu o tulburare cronică de tip inflamator sau o agresiune care solicită sistemul imunitar. Raportul Nf/Lf crescut înregistrat în prima parte a experimentului (lotul martor pozitiv și lotul LI (HEA-1)) denota caracterul inflamator prezent la subiecții luați în studiu asociindu-se totodată și cu o stimulare a axului hipotalamus-hipofiza-corticosuprarenala întâlnită în stări de solicitare a organismului. Ulterior, se poate aprecia efectul compensator al activării mecanismelor adaptative la nivel de organism, cu tendința spre reducere a raportului Nf/Lf (fig 3.26).

În ceea ce privește numărul total de leucocite circulante, se remarcă o scădere graduală pentru indivizii tuturor loturilor investigate, astfel încât valorile înregistrate variază între 13 și $4.45 \times 10^3/\mu\text{l}$, explicând astfel solicitarea intensă sau o insuficiență a sistemului imunitar al organismului. Comparativ cu media valorilor obținute inițial, se remarcă o scădere accentuată a numărului de leucocite totale pentru indivizii lotului L1 (scădere de 42%), urmat de lotul L2 (38%), respectiv lotul martor (scădere de 29 procente).

Biomaterialele au capacitatea de a induce osteogeneza, osteoinducție și osteoconducție. Osteogeneza este procesul de formare a oaselor atunci când celulele osteoprogenitoare și osteoblastele sunt prezente. Osteoinducție este definit ca un proces de recrutare a celulelor mezenchimale și diferențierea lor în celule osteoblaste, rezultând un os în formare. Osteoconducția este procesul de formare a unei schele pentru creșterea oaselor noi. (Baldini și col 2011, Ilan, Ladd, 2002, Zimmermann, Moghaddam, 2011)

Țesuturile cele mai solicitate pentru implantul unor aliaje sunt pielea și osul. Aceste țesuturi au câteva caracteristici comune reprezentate de căi de semnalizare și compoziție a matricei extracelulare (Salbach și col 2012).

Glicozaminoglicanii în a căror structură intra acidul hialuronic și sulfatul de condroitină, sunt componentele principale ale matricei extracelulare organice. Aceștia modulează atragerea și diferențierea celulelor precursorilor regenerării pielii și oaselor (Salbach și col 2012).

Reacția organismului de acoperire a implantului cu fibrile de colagen și chondroitin sulfat favorizează aderența și diferențierea osteoblastelor și osteointegrarea (Rammelt și col 2007, Douglas și col 2008). GAG-urile sunt molecule foarte importante care promovează activitățile de osteogeneza. Matricea extracelulară provizorie care s-a format, evoluează treptat într-o zonă extrem de vascularizată, care va furniza sprijin suplimentar pentru migrarea și diferențierea celulelor. Un răspuns similar a fost observat și în siturile peri-implant osos la șobolani din loturile experimentale cu diverse aliaje și a fost raportat și în literatură la șoareci (Mouraret și col 2014, Tadde și col 2012) și șobolani (Lin și col 2011).

S-a constatat atât osificare intramembranoasă cât și endocondrală, fără celule specifice proceselor inflamatorii, ceea ce sugerează o compatibilitate a aliajelor cu țesutul osos. De asemenea nu s-au observat procese de necroză sau proliferații patologice ale țesuturilor luate în studiu.

În timp ce inflamația normală a țesuturilor se finalizează cu vindecarea, răspunsul imun la un biomaterial, respectiv starea inflamatorie este prelungită datorită activării continue a celulelor inflamatorii. Acest proces de vindecare perturbat duce în cele din urmă la un răspuns fibrotic și la o încapsulare a biomaterialelor care deseori afectează performanța implantului (Franz și col 2011). Fibroblastele sunt principala sursă a acid hialuronic dermic (HA) (Averbeck și col 2007, Gebhardt și col 2010). În timpul fazei de proliferare a vindecării rănilor, sinteza de novo a GAG-urilor este foarte crescută (Jokela și col 2008) și persistă la niveluri ridicate (mai ales acidul hialuronic) în țesuturile de granulație, și se pare că determină vindecarea fără cicatrici (West și col 1997, Monslow și col.2009).

În leziunile cronice procesul de vindecare este de asemenea blocat în faza inflamatorie prelungită. Eliberarea persistentă a metaloproteinelor, elastazei și a speciilor reactive de oxigen (ROS) afectează țesuturile din jur, distruge componentele matricei extracelulare, în timp ce factorii de creștere și receptorii lor sunt foarte implicați în răspunsul de vindecare (Wiegand și col.2010, Moseley și col 2004).

GAG-urile, inclusiv CS și HA, sunt cunoscute că acționează ca imunosupresoare. CS reduce expresia MMP-urilor, IL-1 β , TNF α , COX-2 și NOS2 prin blocarea căii de semnalizare NF- κ B, creând astfel un mediu antiinflamator (Vallieres, du Souich 2010)). Prezența GAG a fost semnalată la toate loturile experimentale, cu acțiune benefică. Capsulele peri-implant nu au avut dimensiuni mari ceea ce a contribuit la efectul inductor. Nu s-au evidențiat celule și procese inflamatorii, necroze sau procese tumorale.

O particularitate a constituit-o lotul 2 (cu implant HEA-2 sc), la care s-a observat depunerea materialului bazofil, indicând formarea de particule minerale și țesuturi cu osteoid caracteristic. Cu toate acestea, în acest studiu, nu s-a observat formarea osului ectopic. Regiunile cu un material bazofil, indică formarea unei porțiuni minerale și formarea țesuturilor cu caracteristici similare cu un osteoid, fapt care confirmă datele din literatură. (Pripatnanont și col 2009).

Concluzii

1. Noile materialele cu entropie ridicată (HEA – high entropy alloys), reprezentate în studiul nostru de HEA-1 (MoNbTaTiZr) și HEA-2 (FeMoTaTiZr), preparate de Universitatea Tehnică București, au fost testate *in vivo* la șobolani Wistar prin implantare subcutanată în regiunea toracică laterală stângă și intraosoasă în creasta tibială la nivelul membrului posterior drept (Clinica de Chirurgie a USAMV Iași).

2. Examenele imagistice (radiografice și computer tomografice) au evidențiat aspectele caracteristice de formă, dimensiune, suprafețe ale implantului cu aspect radioopac de corp metalic și prezența zonelor de radiotransparență periimplant, la nivelul crestei tibiale în prima săptămână după implantare, ca urmare a pierderii de substanță osoasă.

3. La două luni postimplant, radiologic s-a evidențiat calusarea canalului osos de implantare, iar tomografic îngroșarea corticalei osoase, fără demineralizare, la șobolani din lotul LI

(HEA-1), și o moderată tumefacție a țesutului subcutanat periimplant la șobolanii din lotul LII (HEA II). La 3,5 luni postimplant, creșterea grosimii corticalei osoase observată la lotul LI (HEA-1) este compatibilă cu reactivitatea osoasă.

4. Examenul histologic a relevat la șobolanii din lotul LI cu implant s.c. (HEA-1) o proliferare redusă a fibrelor de collagen periimplant, precum și a celulelor mezenchimale din vecinătate care se diferențiază în celule secretoare de glicozaminoglicani. Implantul s.c. la lotul LII (HEA-2) evidențiază modificări mult mai consistente, atât periimplant, cât și la distanță: o teacă conjunctivă mai groasă formată din fibre de collagen, celule conjunctive și acumulare de glicozaminoglicani la nivelul dermului, în plus, la unii indivizi s-a observat depunere de material bazofil care indică formarea de particule minerale și țesut osteoid.

5. Implantul osos în creasta tibială la lotul LI (HEA-1) a indus modificări histologice compatibile cu procesul de osificare endocondrală, precum și formare de țesut osos nou, de tip trabecular. La lotul II cu implant osos (HEA-2), examenul histologic a relevat prezența osteoblastelor diferențiate din celule mezenchimale, cu osificare periimplant pe model membranos.

6. Examenul hematologic a evidențiat pe linia eritocitară diminuarea hematocritului în mod progresiv la ambele loturi cu implant HEA, spre deosebire de creșterea hematocritului la lotul martor negativ și diminuarea acestuia doar la momentul T1 (prima săptămână post-implant) la lotul martor pozitiv. Aceste modificări explică un posibil efect citopenic (direct asupra celulelor roșii sanguine sau prin supresie medulară), mai accentuat la LI față de LII, prin eliberare lentă a unora dintre compușii biomaterialelor analizate.

7. Reactivitatea inflamatorie și a sistemului imunitar al șobolanilor a prezentat variații semnificative între loturile luate în studiu, de remarcat fiind diminuarea progresivă a numărului de leucocite totale circulante la toate loturile, scăderea față de momentul T0 fiind mai accentuată la lotul LI (cu 42 %), urmată de lotul L2 (cu 38 %) și de martor (cu 29 %). Modificarea raportului Nf/Lf, indicatorul principal al inflamației, a crescut după prima săptămână de la implantare la martor, dar s-a redus semnificativ la ambele loturi cu implant HEA, mai accentuat la lotul LII, apoi a revenit către valorile inițiale spre sfârșitul perioadei de implantare, ceea ce explică toleranță locală, cu reactivitate sistemică lentă, adaptativă.

Bibliografie

1. ASM (2005) ASM handbook, vol 2: Properties and selection: nonferrous alloys & special purpose materials. ASM International, Materials Park ASTM (2001)
2. ASTM B 80: standard specification for magnesium-alloy sand castings. ASTM International, West Conshohocken ASTM (2003)
3. ASTM F 138: standard specification for wrought 18chromium-14nickel-2.5molybdenum stainless steel bar and wire for surgical implants (UNS S31673). ASTM International, West Conshohocken
4. Biesiekierski, A., Ping, D., Yamabe-Mitarai, Y. & Wen, C. Impact of ruthenium on microstructure and corrosion behavior of β -type Ti-Nb-Ru alloys for biomedical applications. *Mater Design* 59, 303–309 (2014).
5. Biesiekierski, A., Wang, J., Gepreel, M. A. H. & Wen, C. A new look at biomedical Ti-based shape memory alloys. *Acta Biomater* 8, 1661–1669 (2012).
6. Bingmann, D. and Tetsch, P. (1986) Untersuchungen zur Biokompatibilität von Implantatmaterialien. *Dt. Zeitschr. f. Zahnärztl. Implantol.*, Bd. II, 190.
7. Brånemark, P.I., Adell, R., Albrektsson, T., Lekholm, U. Lundkvist, S. and Rockler, B. (1983) Osseointegrated Titanium Fixtures in the Treatment of Edentulousness. *Biomaterials*, 4,
8. Breme, J. Steinhäuser, E. and Paulus, G. (1988) Commercially Pure Titanium Steinhäuser Plate-Screw System for Maxillo facial Surgery. *Biomaterials*, 9, 310–313.
9. Chen S, Guan S, Li W, Wang H, Chen J, Wang Y (2012) In vivo degradation and bone response of a composite coating on Mg-Zn-Ca alloy prepared by microarc oxidation and electrochemical deposition. *J Biomed Mater Res B* 100:533–543
10. Chng CB, Lau DP, Choo JQ, Chui CK (2012) Bio-absorbable micro-clip for laryngeal microsurgery—design and evaluation. *Acta Biomater.* doi:10.1016/j.actbio.2012.1003.1051

11. Di Mario C, Griffiths H, Goktekin O, Peeters N, Verbist J, Bosiers M, Deloose K, Heublein B, Rohde R, Kasese V, Ilsley C, Erbel R (2004) Drug-eluting bioabsorbable magnesium stent. *J Interv Cardiol* 17:391–395
12. El-Omar MM, Dangas G, Iakovou I, Mehran R (2001) Update on in-stent restenosis. *Curr Interv Cardiol Rep* 3:296–305
13. Erdmann N, Angrisani N, Reifenrath J, Lucas A, Thorey F, Bormann D, Meyer-Lindenberg A (2011) Biomechanical testing and degradation analysis of MgCa0.8 alloy screws: a comparative in vivo study in rabbits. *Acta Biomater* 7:1421–1428
14. Eisenbarth, E., Velten, D., Muller, M., Thull, R. & Breme, J. Biocompatibility of beta-stabilizing elements of titanium alloys. *Biomaterials* 25, 5705–5713 (2004).
15. Ernstberger, T., Buchhorn, G. & Heidrich, G. Artifacts in spine magnetic resonance imaging due to different intervertebral test spacers: an in vitro evaluation of magnesium versus titanium and carbon-fiber-reinforced polymers as biomaterials. *Neuroradiology* 51, 525–529 (2009).
16. Ferguson, A.B., Akahashi, Y., Laing, P.G. and Hodge, E.S. (1962) *J. Bone and Joint Surg.*, **44**, 323.
17. Fraker, A.C., Ruff, A.W., Sung, P. von Orden, A.C. and Speck, K.M. (1983) Surface Preparation and Corrosion Behaviour of Titanium Alloys for Surgical Implants, in *Titanium Alloys in Surgical Implants*, (eds H.A. Cuckey and F. Kubli), ASTM STP 796, pp. 206–219.
18. Frazier, M.E. and Andrews, T.K. (1979), in *Trace Metals in Health and Disease* (ed. N. Karash), Raven Press, NY, 71.
19. Geurtsen, W. Biocompatibility of dental casting alloys. *Crit Rev Oral Biol M* 13, 71–84 (2002).
20. Goodfellow (2010) Iron (Fe)—material information (2010) Goodfellow Corp. <http://www.goodfellow.com/csp/active/STATIC/A/Iron.HTML>.
21. Hänzi AC, Sologubenko AS, Uggowitzer PJ (2009) Design strategy for microalloyed ultra-ductile magnesium alloys for medical applications. *Mater Sci Forum* 618–619:75–82
22. Hänzi AC, Metlar A, Schinhammer M, Aguib H, Lüth TC, Löffler JF, Uggowitzer PJ (2011) Biodegradable wound-closing devices for gastrointestinal interventions: degradation performance of the magnesium tip. *Mater Sci Eng C* 31:1098–1103
23. Hermawan H, Mantovani D (2009) Degradable metallic biomaterials: the concept, current developments and future directions. *Minerva Biotechnol* 21:207–216
24. Hermawan H, Mantovani D (2011) New generation of medical implants: metallic biodegradable coronary stent. In: 2nd international conference on instrumentation, communications, information technology, and biomedical engineering (ICICI-BME), Bandung, 8–9 November 2011, pp 399–402
25. Hermawan H, Alamdari H, Mantovani D, Dubé D (2008) Iron-manganese: new class of degradable metallic biomaterials prepared by powder metallurgy. *Powder Metall* 51:38–45
26. ermawan H, Dube D, Mantovani D (2010) Developments in metallic biodegradable stents. *Acta Biomater* 6:1693–1697
27. Heublein B, Rohde R, Kaese V, Niemeyer M, Hartung W, Haverich A (2003) Biocorrosion of magnesium alloys: a new principle in cardiovascular implant technology. *Heart* 89:651–656
28. Kannan MB, Raman RKS (2008) In vitro degradation and mechanical integrity of calciumcontaining magnesium alloys in modified-simulated body fluid. *Biomaterials* 29:2306–2314
29. Kraus T, Fischerauer SF, Hänzi AC, Uggowitzer PJ, Löffler JF, Weinberg AM (2012) Magnesium alloys for temporary implants in osteosynthesis: in vivo studies of their degradation and interaction with bone. *Acta Biomater* 8:1230–1238
30. Levesque J, Dube D, Fiset M, Mantovani D (2003) Investigation of corrosion behaviour of magnesium alloy AM60B-F under pseudo-physiological conditions. *Mater Sci Forum* 426–432:521–526
31. Li Z, Gu X, Lou S, Zheng Y (2008) The development of binary Mg-Ca alloys for use as biodegradable materials within bones. *Biomaterials* 29:1329–1344
32. Matsuura, H. et al. Quantification of susceptibility artifacts produced on high-field magnetic resonance images by various biomaterials used for neurosurgical implants-Technical note. *J Neurosurg* 97, 1472–1475 (2002).
33. Matsuura, H. et al. Quantitative analysis of magnetic resonance imaging susceptibility artifacts caused by neurosurgical biomaterials: Comparison of 0.5, 1.5. and 3.0 Tesla magnetic fields. *Neurol Med-Chir* 45, 395–398 (2005).

34. Mears, D.C. (1975) The Use of Dissimilar Metals Surgery. *J. Biomed. Mat Res.*, **6**, 133.
35. Messer, R. L. W. & Lucas, L. C. Evaluations of metabolic activities as biocompatibility tools: a study of individual ions' effects on fibroblasts. *Dent Mater* 15, 1–6 (1999).
36. Niinomi, M., Nakai, M. & Hieda, J. Development of new metallic alloys for biomedical applications. *Acta Biomater* 8, 3888–3903 (2012).
37. Nomura, S. N. et al. Microstructure and magnetic susceptibility of as-cast Zr-Mo alloys. *Acta Biomater* 6, 1033–1038 (2010).
38. Okamoto, H. The Ru–Zr system (ruthenium-zirconium). *J Phase Equilib* 14, 225–227 (1993).
39. Olsrud, J., Latt, J., Brockstedt, S., Romner, B. & Bjorkmann-Burtscher, I. M. Magnetic resonance imaging artifacts caused by aneurysm clips and shunt valves: Dependence on field strength (1.5 and 3 T) and imaging parameters. *J Magn Reson Imaging* 22, 433–437 (2005).
40. Peeters P, Bosiers M, Verbist J, Deloose K, Heublein B (2005) Preliminary results after application of absorbable metal stents in patients with critical limb ischemia. *J Endovasc Ther* 12:1–5
41. Peuster M, Wohlsein P, Bruggmann M, Ehlerding M, Seidler K, Fink C, Brauer H, Fischer A, Hausdorf G (2001) A novel approach to temporary stenting: Degradable cardiovascular stents produced from corrodible metal-results 6–18 months after implantation into New Zealand white rabbits. *Heart* 86:563–569
42. Peuster M, Hesse C, Schloo T, Fink C, Beerbaum P, Schnakenburg CV (2006) Long term biocompatibility of a corrodible peripheral iron stent in the porcine descending aorta. *Biomaterials* 27:4955–4962
43. Schinhammer M, Hänni AC, Löffler JF, Uggowitzer PJ (2010) Design strategy for biodegradable Fe-based alloys for medical applications. *Acta Biomater* 6:1705–1713
44. Schomig A, Kastrati A, Mudra H, Blasini R, Schuhlen H, Klauss V, Richardt G, Neumann FJ (1994) Four-year experience with Palmaz-Schatz stenting in coronary angioplasty complicated by dissection with threatened or present vessel closure. *Circulation* 90:2716–2724
45. Serruys PW, Kutryk MJ, Ong AT (2006) Coronary-artery stents. *N Engl J Med* 354:483–495
- Stack RS, Califf RM, Phillips HR, Pryor DB, Quigley PJ, Bauman RP, Tchong JE, Greenfield JC Jr (1988) Interventional cardiac catheterization at Duke Medical Center. *Am J Cardiol* 62:3F–24F
46. Schutz, R. Ruthenium enhanced titanium alloys. *Platin Met Rev (UK)* 40, 54–61 (1996).
47. Semlitsch, M. Staub, T. and Weber, H. (1985) Titanium-Aluminium-Niobium Alloy, Development for Biocompatible, High Strength Surgical Implants. *Biomed. Tech.* **30(12)**, 334–339.
48. Steinemann, S.G. and Perren, S.M. (1984) Titanium Alloys as Metallic Biomaterials, in *Proc. of the 5th World Conf on Titanium*, Vol 2, pp. 1327–1334.
49. Tengvall, P., Lundström, J., Sjöquist, L., Elwing, H. and Björsten, L.M. (1989) Titanium-Hydrogen Peroxide Interactions. Model Studies of the Influence of the Inflammatory Response on Titanium Implants. *Biomaterials* **10(3)** 166–175.
50. Tamai H, Igaki K, Kyo E, Kosuga K, Kawashima A, Matsui S, Komori H, Tsuji T, Motohara S, Uehata H (2000) Initial and 6-month results of biodegradable poly-L-lactic acid coronary stents in humans. *Circulation* 102:399–404
51. United States Patent and Trademark Office (2011). <http://www.uspto.gov>. Accessed 30 Oct 2011 US National Library of Medicine and the National Institutes of Health (2011). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>.
52. Van der Giessen WJ, Lincoff AM, Schwartz RS, van Beusekom HM, Serruys PW, Holmes DR Jr, Ellis SG, Topol EJ (1996) Marked inflammatory sequelae to implantation of biodegradable and nonbiodegradable polymers in porcine coronary arteries. *Circulation* 94:1690–1697
53. Yamamoto, A., Honma, R. & Sumita, M. Cytotoxicity evaluation of 43 metal salts using murine fibroblasts and osteoblastic cells. *J Biomed Mater Res* 39, 331–340 (1998).
54. Waksman R, Pakala R, Kuchulakanti PK, Baffour R, Hellinga D, Seabron R, Tio FO, Wittchow E, Hartwig S, Harder C, Rohde R, Heublein B, Andrae A, Waldmann K-H, Haverich A (2006) Safety and efficacy of bioabsorbable magnesium alloy stents in porcine coronary arteries. *Catheter Cardiovasc Interv* 68:606–617
55. Waksman R, Pakala R, Baffour R, Seabron R, Hellinga D, Tio FO (2008) Short-term effects of biocorrodible iron stents in porcine coronary arteries. *J Interv Cardiol* 21:15–20
56. Witte F, Kaese V, Haferkamp H, Switzer E, Linderberg AM, Wirth CJ, Windhagen H (2005) In vivo corrosion of four magnesium alloys and the associated bone response. *Biomaterials* 26:3557–3563

57. Xin Y, Liu C, Zhang X, Tang G, Tian X, Chu PK (2007) Corrosion behavior of biomedical AZ91 magnesium alloy in simulated body fluids. *J Mater Res* 22:2004–2011
58. Zhang E, Yang L (2008) Microstructure, mechanical properties and bio-corrosion properties of Mg-Zn-Mn-Ca alloy for biomedical application. *Mater Sci Eng, A* 497:111–118
59. Zhang E, Xu L, Yu G, Pan F, Yang K (2009) In vivo evaluation of biodegradable magnesium alloy bone implant in the first 6 months implantation. *J Biomed Mater Res A* 90:882–893.
60. Zhou, F. Y. et al. Screening on binary Zr–1X (X = Ti, Nb, Mo, Cu, Au, Pd, Ag, Ru, Hf and Bi) alloys with good in vitro cytocompatibility and magnetic resonance imaging compatibility. *Acta Biomater* 9, 9578–9587 (2013).
61. Zitter, H. and Plenk, H. (1987) The Electrochemical Behaviour of Metallic Implant Materials as an Indicator of their Biocompatibility. *J. of Biomedical Materials Research*, **21**, 881.
62. Zwicker, U., Bühler, U., Müller, R., Beck, H., Schmid, H.J. and Ferstl, J. (1980) Mechanical Properties and Tissue Reactions of a Titanium Alloy for Implant Material, in *Proc. of the 4th World Conf on Titanium*, Vol. 1, pp. 505–514.
63. Zwicker, U., Etzold, U. and Moser, Th. (1984) Abrasive Properties of Oxide Layers on TiAl5Fe2.5 in Contact with High Density Polyethylene, in *Proc. of the 5th World Conf. on Titanium*, Vol. 2, pp. 1343–1350.

Lucrări citate ISI publicate din grant

Spataru, M.-C.; Cojocaru, F.D.; Sandu, A.V.; Solcan, C.; Duceac, I.A.; Baltatu, M.S.; Voiculescu, I.; Geanta, V.; Vizureanu, P. Assessment of the Effects of Si Addition to a New TiMoZrTa System. *Materials* **2021**, *14*, 7610. <https://doi.org/10.3390/ma14247610>

Mihaela Claudia Spataru, Maria Butnaru, Andrei Victor Sandu, Vasile Vulpe, Maria Daniela Vlad, Madalina Simona Baltatu, Victor Geanta, Ionelia Voiculescu, Petrică Vizureanu, Carmen Solcan, 2021, In-depth assessment of new Ti-based biocompatible materials, *Materials Chemistry and Physics*, Volume 258, 2021, 123959, ISSN 0254-0584, <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2020.123959>.

Baltatu, M.S.; Spataru, M.C.; Verestiuc, L.; Balan, V.; Solcan, C.; Sandu, A.V.; Geanta, V.; Voiculescu, I.; Vizureanu, P. Design, Synthesis, and Preliminary Evaluation for Ti-Mo-Zr-Ta-Si Alloys for Potential Implant Applications. *Materials* **2021**, *14*, 6806. <https://doi.org/10.3390/ma14226806>

Baltatu I, Sandu AV, Vlad MD, Spataru MC, Vizureanu P, Baltatu MS. Mechanical Characterization and In Vitro Assay of Biocompatible Titanium Alloys. *Micromachines*. 2022; 13(3):430. <https://doi.org/10.3390/mi13030430>

Liliana Verestiuc, Mihaela-Claudia Spataru, Madalina Simona Baltatu, Maria Butnaru, Carmen Solcan, Andrei Victor Sandu, Ionelia Voiculescu, Victor Geanta, Petrica Vizureanu, New Ti–Mo–Si materials for bone prosthesis applications, *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, Volume 113, 2021, 104198, ISSN 1751-6161, <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2020.104198>.

Baltatu, MS, Tugui, CA ; Perju, MC; Benchea, M; Spataru, MC; Sandu, AV; Vizureanu, P ,2019 Biocompatible Titanium Alloys used in Medical Applications, *REVISTA DE CHIMIE*, Volume 70 Issue 4 Page 1302-1306

Munteanu C, Vlad DM, Sindilar E-V, Istrate B, Butnaru M, Pasca SA, Nastasa RO, Mihai I, Burlea S-L. Novel Mg-0.5Ca-xMn Biodegradable Alloys Intended for Orthopedic Application: An In Vitro and In Vivo Study. *Materials*. 2021; 14(23):7262. <https://doi.org/10.3390/ma14237262>

Sindilar, E.-V.; Munteanu, C.; Pasca, S.A.; Mihai, I.; Henea, M.E.; Istrate, B. Long Term Evaluation of Biodegradation and Biocompatibility In-Vivo the Mg-0.5Ca-xZr Alloys in Rats. *Crystals* **2021**, *11*, 54. <https://doi.org/10.3390/cryst11010054>