



UNIVERSITATEA POLITEHNICĂ DIN BUCUREȘTI
ȘCOALA DOCTORALĂ ȘTIINȚA ȘI INGINERIA MATERIALELOR
DEPARTAMENTUL DE ȘTIINȚA MATERIALELOR METALICE,
METALURGIE FIZICĂ



Rezumat al tezei de doctorat

**CONTRIBUȚII PRIVIND DEZVOLTAREA UNOR NOI
MATERIALE DIN CATEGORIA CIMENTURILOR ACRILICE
ANTIMICROBIENE UTILIZATE PENTRU FIXAREA
ENDOPROTEZELOR DE ȘOLD**

Doctorand: Ing. IVANOV ALINA (căsătorită ROBU)

Coordonator științific: Prof. Univ.Habil.Dr.Ing. ANTONIAC VASILE IULIAN

București 2022



UNIVERSITATEA POLITEHNICĂ DIN BUCUREȘTI
ȘCOALA DOCTORALĂ ȘTIINȚA ȘI INGINERIA MATERIALELOR
DEPARTAMENTUL DE ȘTIINȚA MATERIALELOR METALICE,
METALURGIE FIZICĂ



TEZĂ DE DOCTORAT

**Contribuții privind dezvoltarea unor noi materiale din categoria
cimenturilor acrilice antimicrobiene utilizate pentru fixarea
endoprotezelor de șold**

**Contributions regarding the development of new
Materials in the category of antimicrobial acrylic cements used for
fixing hip endoprostheses**

Doctorand: Ing. IVANOV ALINA (căsătorită ROBU)

Coordonator științific: Prof. Univ.Habil.Dr.Ing. ANTONIAC VASILE IULIAN

Comisia de doctorat

Președinte	Prof.dr. ing. PREDESCU Cristian	Universitatea Politehnică din București
Conducător de doctorat	Prof. Habil. Univ. Dr.Ing. ANTONIAC Vasile Iulian	Universitatea Politehnică din București
Referenți științifici	Prof. dr. ing. MUNTEANU Corneliu	Universitatea Tehnică „Gheorghe Asachi” din Iași
	Prof. habil. dr. med. NICULESCU Marius	Universitatea Titu Maiorescu din București
	Conf. dr. ing. COTRUȚ Mihai Cosmin	Universitatea Politehnică din București

București 2022

Cuprinsul rezumatului tezei de doctorat	
INTRODUCEREA	3
Abstract	4
PREZENTAREA SINTETICĂ A CAPITOLELOR TEZEI DE DOCTORAT	
PARTEA I	Error! Bookmark not defined.
Cap.1. Stadiul actual al cercetărilor privind cimenturile acrilice utilizate în chirurgia ortopedică pentru fixarea endoprotezelor de șold	5
Cap.2 Obiectivele tezei de doctorat	6
Cap. 3 Metode și echipamente utilizate în cercetările experimentale	6
3.1. Materiale utilizate și obținerea eşantioanelor experimentale	6
3.2. Metode și echipamente utilizate în cercetările experimentale.....	7
Cap.4. Studiu de caz și cercetări experimentale privind influența cimenturilor osoase utilizate și a tehnicii de cimentare a endoprotezelor de șold tip BHR asupra eșecului acestora în practica clinică	100
4.1. Prezentarea problemei și a protocolului de lucru utilizat pentru rezolvarea acesteia	100
4.2. Identificarea cauzelor de eșec ale endoprotezelor de șold tip BHR prin analize de microscopie	10
4.3. Analiza comparativă <i>in vitro</i> a cimenturilor comerciale (Aminofix 1, Aminofix 3, Simplex P) utilizate în practica clinică pentru fixarea endoprotezelor de șold tip BHR la o clinică de ortopedie.....	12
4.3.1. Rezultate experimentale de microscopie electronică de baleiaj SEM și spectrometrie ED.....	13
4.3.2. Rezultate experimentale privind umectabilitatea cimenturilor	13
4.3.3. Rezultate experimentale privind proprietățile mecanice ale cimenturilor	13
4.4. Concluzii	15
Cap.5. Studiu de caz și cercetări experimentale privind selecția unui ulei esențial cu proprietăți antimicrobiene optime, utilizabil la dezvoltarea unor noi cimenturilor osoase antimicrobiene	16
5.1. Caracterizarea fizico - chimică a uleiurilor esențiale testate	16
5.2. Evaluarea efectului antimicrobian a uleiurilor esențiale testate	17
5.3. Concluzii rezultate în urma caracterizării fizico - chimice și antimicrobiene a celor trei uleiuri esențiale analizate	20
Cap.6 Caracterizarea și testarea unor noi cimenturi osoase cu proprietăți antimicrobiene	20
6.1. Caracterizarea morfologică și structurală.....	20
6.1.1. Determinări experimentale de microscopie electronică de baleiaj (SEM) cuplată cu spectroscopie de raze X cu dispersie după energie (EDS)	20
6.1.2. Determinări experimentale de spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier – FTIR	23
6.1.3. Determinări experimentale de Spectroscopie Raman	23
6.1.4. Determinări experimentale de difracție de raze X cu dispersie de energie (EDXRD)	24
6.2. Evaluarea proprietăților eşantioanelor experimentale de cimenturi osoase.....	24
6.2.1. Rezultate experimentale pentru evaluarea proprietăților de umectabilitate	24
6.2.2. Rezultate experimentale privind determinarea gradului de hidratare	25
6.2.3. Rezultate experimentale pentru determinarea ratei de degradare	26
6.2.4. Studiu experimental privind determinarea proprietăților mecanice	27
6.3. Evaluarea activității antimicrobiene și a biocompatibilității eşantioanelor experimentale	28
6.3.1. Rezultate experimentale de determinare calitativă a activității antimicrobiene	28
6.3.2. Rezultate experimentale de determinare a capacității de aderență a tulpinilor microbiene la suprafața probelor de ciment osos	29
6.3.3. Rezultate experimentale de determinare a biocompatibilității cimenturilor osoase	29
6.3.4. Concluzii privind evaluarea antimicrobiană și a biocompatibilității eşantioanelor experimentale	31
Cap.7. Concluzii, contribuții proprii și direcții viitoare	31
7.1. Concluzii și contribuții proprii	31
7.2. Contribuții proprii și posibilități de valorificare ale cercetărilor	33
7.3. Direcții viitoare de cercetare	35
7.4. Diseminarea rezultatelor obținute	36
Lista figurilor	37
Lista tabelor	41
Lista abrevierilor	42
Bibliografie selectivă	43

Mulțumiri

Această teză ar fi fost imposibilă fără ajutorul, sprijinul și îndrumarea unor oameni minunați care, prin modul lor de a fi, au contribuit la formarea mea ca om, însuflându-mi dorința de a o finaliza. Le mulțumesc încă o dată pentru toate acele lecții de viață oferite de-a lungul timpului și pentru exemplul pe care l-au constituit pentru mine.

În primul rând, vreau să mulțumesc conducătorului științific al acestei teze de doctorat, domnului prof. univ. habil. dr. ing. Iulian Vasile Antoniac de la Universitatea Politehnica din București, pentru încredere, profesionalism și calitatea științifică oferită, dar mai ales pentru timpul, răbdarea și înțelegerea de care a dat dovadă tot timpul.

În continuare, doresc să îmi exprim gratitudinea față de membrii comisiei de susținere a tezei de doctorat pentru sfaturile și sugestiile oferite. Doresc să mulțumesc în mod special domnului Prof.habil.dr. ing. Predescu Cristian care mi-a făcut onoarea să accepte să fie președintele comisiei de doctorat. De asemenea, doresc să le mulțumesc Prof.habil.dr. ing. Corneliu Munteanu, domnului Prof.habil.dr. ing. Marius Niculescu și domnului Conf.dr. ing. Cosmin Cotruș pentru răbdarea cu care au analizat lucrarea de față precum și pentru sugestiile formulate.

Această teză de doctorat nu ar fi fost completă fără sprijinul și ajutorul esențial al unor cadre didactice de la Facultatea de Știința și Ingineria Materialelor, Universitatea Politehnica din București, respectiv prof.univ.habil.dr.ing. Florin Miculescu, prof.univ.habil.dr.ing. Marian Miculescu, S.L.dr.ing. Robert Ciocoiu, S.L.dr.ing. Octavian Trante și S.L.dr.ing. Ana Iulia Bița. Le mulțumesc pentru timpul, ajutorul și sfaturile științifice prețioase acordate.

De asemenea îi mulțumesc doamnei Prof.dr. Lia Mara Dițu de la Universitatea din București, Facultatea de Biologie, Departamentul de microbiologie, doamnei lector dr. Anca Daniela Raiciu și doamnei CS II Elena Grosu pentru implicare și ajutorul neprețuit.

De asemenea îi mulțumesc doamnei CS III Aurora Antoniac, de la Universitatea Politehnica din București pentru timpul, sfaturile științifice, îndrumarea permanentă dar mai ales răbdarea acordate pe parcursul elaborării și realizării acestei teze de doctorat, contribuind astfel la formarea mea profesională și ca om.

Doresc să le mulțumesc tuturor profesorilor care de-a lungul timpului mi-au însoțit și călăuzit pașii, dar și pentru însuflarea dorinței de a cunoaște și de a experimenta. În mod special doresc să adresez mulțumirile mele domnului prof.dr.ing Daniel Bunea și doamnei prof.dr.ing. Georgeta Coșmeleață pentru susținerea și încrederea acordată în momentele importante. Să va fie bine acolo unde sunteți!

Mulțumiri tuturor colegilor doctoranzi, cadrelor didactice din Departamentul Știința Materialelor Metalice Metalurgie Fizică, Facultatea de Știința și Ingineria Materialelor, Universitatea Politehnica din București, tuturor prietenilor care m-au încurajat și susținut.

Cu deosebită recunoștință și dragoste, dedic această teză soțului meu Daniel și copiilor mei Diana și Andrei, care au fost alături de mine, m-au înconjurat cu afecțiunea și răbdarea lor și care m-au sprijinit din toate punctele de vedere.

În mod deosebit le mulțumesc celor care au avut răbdare să citească și să corecteze această teză și care m-au ajutat din toate punctele de vedere în această perioadă.

Vă mulțumesc!

ABSTRACT

Am efectuat o analiză statistică a rezultatelor clinice privind utilizarea protezelor de tip BHR într-o clinică de ortopedie, pentru a identifica cauzele de eșec a acestora. Am prelevat explante de la pacienți cu artroplastie de refacere a soldului și le-am analizat din punct de vedere al interfeței cimentului osos cu biomaterialul metalic. Rezultatele au evidențiat faptul că eșecurile au la bază mai multe posibile cauze printre care tipul de ciment utilizat, tehnica deficitară de preparare și utilizarea inadecvată a cimenturilor osoase. Drept urmare am efectuat un al doilea studiu experimental, respectiv analiza comparativă *in vitro* a cimenturilor comerciale utilizate la fixarea endoprotezelor de șold analizate urmând cronologia intervenției chirurgicale din care a rezultat faptul că procesul de manipulare influențează structura și proprietățile cimenturilor osoase. Ulterior a fost realizat un studiu de caz și cercetări experimentale pentru selecția unui ulei esențial cu proprietăți antimicrobiene optime, utilizabil la dezvoltarea unor noi cimenturi osoase. Concluzia acestuia fost că uleiul de mentă este cel mai eficient și are proprietățile potrivite pentru a fi utilizabil la dezvoltarea unor noi cimenturi osoase antimicrobiene. Am obținut noi cimenturi osoase cu proprietăți antimicrobiene, prin modificarea componentei anorganice a unui ciment comercial pe bază de PMMA, cu vâscozitate standard, utilizând ca agenți antimicrobiene, nanoparticule de argint înglobate într-o sticlă ceramică și hidroxiapatită impregnată cu ulei de mentă și gentamicină și am realizat caracterizarea morfologică și structurală, evaluarea proprietăților și evaluarea activităților antimicrobiene și de biocompatibilitate a eșantioanelor experimentale de cimenturi osoase noi obținute.

Concluziile evidențiază faptul că proprietățile analizate și performanța cimenturilor osoase cu ulei esențial de mentă și nanoparticule de argint împotriva agenților patogeni testați sugerează că acești aditivi antimicrobieni par promițători a fi utilizați în practica clinică împotriva tulpinilor microbieni analizate.

Cuvinte cheie: endoproteze de șold, cimenturi osoase PMMA; ulei esențial de mentă; nanoparticule de argint; gentamicina; proprietăți antimicrobiene, BHR

INTRODUCEREA

Prezentarea temei: Contribuții privind dezvoltarea unor noi materiale din categoria cimenturilor acrilice antimicrobiene utilizate pentru fixarea endoprotezelor de șold

În cadrul tezei de doctorat atenția a fost îndreptată spre evaluarea biofuncționalității clinice a unor cimenturi de tip acrilic utilizate pentru fixarea endoprotezelor de șold, și dezvoltarea unor noi biomateriale din categoria cimenturilor de tip acrilic care să prezinte activitate antimicrobiană, prin utilizarea unor aditivi antimicrobieni (nanoparticule de argint, uleiuri esențiale, antibiotice).

Artroplastia totală de șold generează și importante eșecuri care necesită intervenții de revizie. Acestea pot fi diminuate prin culegerea eficientă a datelor obținute prin intermediul cercetărilor și comparând tipurile de implanturi și utilizând măsuratori reproductibile.

În urma studiului de literatură am efectuat o analiză statistică a rezultatelor clinice privind utilizarea endoprotezelor de tip BHR (Birmingham Hip Resurfacing) într-o clinică de ortopedie pentru a identifica cauzele de eșec a acestora. Am prelevat explante de la pacienți cu artroplastie de refacere a soldului și le-am analizat din punct de vedere al interfeței cimentului osos cu biomaterialul metalic. Analizele au evidențiat faptul că eșecurile nu sunt datorate execuției protezei sau a principiului de funcționare al acesteia, ci a mai multor aspecte ca: tipul de ciment utilizat, tehnica deficitară de preparare și utilizarea inadecvată a cimenturilor osoase. Drept urmare am efectuat un al doilea studiu experimental, respectiv analiza comparativă *in vitro* a cimenturilor

comerciale utilizate la fixarea endoprotezelor de șold analizate urmând cronologia intervenției chirurgicale, pentru a evalua factorii care au influențat compoziția chimică și structura fiecărei probe de ciment osos în condiții intraoperatorii specifice. Din rezultatele obținute putem spune că procesul de manipulare a cimentului (etapa de amestecare, etapa de așteptare, etapa de lucru) are un rol important asupra structurii și proprietăților mecanice ale cimenturilor osoase și se recomandă evitarea mixării manuale pentru cimenturile osoase cu vâscozitate scăzută.

Având în vedere faptul că utilizarea pe scară largă a antibioticelor a condus la dezvoltarea unor mecanisme care permit bacteriilor să supraviețuiască în medii cu antibiotice, am realizat un studiu de caz și am efectuat cercetări experimentale pentru selecția unui ulei esențial cu proprietăți antimicrobiene optime, utilizabil la dezvoltarea unor noi cimenturilor osoase. După caracterizarea fizico-chimică și a efectului antimicrobian și ulterior compararea proprietăților a trei uleiuri esențiale a rezultat faptul că uleiul de menta este cel mai eficient și are proprietățile potrivite pentru a fi utilizabil la dezvoltarea unor noi cimenturi osoase antimicrobiene.

Ulterior am obținut noi cimenturi osoase cu proprietăți antimicrobiene, prin modificarea componentei anorganice a unui ciment comercial pe bază de PMMA, cu vâscozitate standard, utilizând ca agenți antimicrobieni, nanoparticule de argint înglobate într-o sticlă ceramică (2% și 4%), respectiv hidroxiapatită impregnată cu ulei de mentă și gentamicină. Au fost obținute astfel trei compoziții de noi cimenturi osoase, pe care, alături de un ciment comercial standard și de un ciment în care a fost adăugat 0,5% gentamicină, am realizat următoarele studii, respectiv caracterizarea morfologică și structurală, evaluarea proprietăților și evaluarea activităților antimicrobiene și de biocompatibilitate a eșantioanelor experimentale de cimenturi osoase noi obținute. Pentru evaluarea efectului antimicrobian au fost utilizate trei tulpini microbiene standard: o tulpină Gram negativă (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853), o tulpină Gram pozitivă (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923), o tulpină levurică (*Candida albicans* ATCC 10231), iar biocompatibilitatea cimenturilor osoase s-a determinat prin evaluarea proliferației celulare prin testul sărurilor de tetrazoliu (MTT).

PREZENTAREA SINTETICĂ A CAPITOLELOR TEZEI DE DOCTORAT

Cap.1. Stadiul actual al cercetărilor privind cimenturile acrilice utilizate în chirurgia ortopedică pentru fixarea endoprotezelor de șold

Articulația șoldului are un rol esențial în organism, locomoția nefiind posibilă fără ea.

Cimenturile osoase sunt utilizate pentru fixarea articulațiilor artificiale, cum ar fi protezele de șold sau protezele de genunchi. Acest material umple spațiul dintre implant și articulație și este introdus ca un amestec fluid, care se întărește cu timpul.

Cimentul PMMA a fost utilizat ca material de cimentare pentru a fixa componenta femurală și componenta acetabulară și pentru a distribui tensiunile de contact între implant și os pe o suprafață mare.

În prezent, cimenturile osoase cele mai frecvent utilizate pot fi clasificate în două categorii: cimenturile osoase de tip acrilic și cimenturile osoase de tip fosfat de calciu.

Cimentul PMMA este unul dintre cele mai rezistente materiale folosite în ortopedie, având un rol extrem de important în activitatea endoprotetică, precum și în alte intervenții reconstructive.

Terapiile cu antibiotice, fie prin administrare sistemică, fie utilizând profilactic cimenturile osoase ce conțin antibiotice, sunt alte modalități de tratament care au contribuit la succesul tot mai mare al intervenției chirurgicale de înlocuire a articulațiilor. Datorită concentrației locale ridicate a unui antibiotic din jurul endoprotezei, utilizarea cimenturilor osoase cu antibiotice în compoziția lor are avantaje mari în comparație cu terapia sistemică cu antibiotice [1].

Utilizarea pe scară largă a antibioticelor a condus la dezvoltarea unor mecanisme genetice și biochimice care permit bacteriilor să supraviețuiască în medii cu antibiotice. Acest lucru este un motiv de îngrijorare în ceea ce privește eficacitatea antibioticelor folosite în mod obișnuit în compoziția cimenturilor osoase, în special eficacitatea gentamicinei.

La acest moment, din punct de vedere comercial, segmentul de piață aferent cimenturilor osoase se împart în două categorii: cimenturi osoase cu antibiotic și cimenturi osoase fără antibiotic. Adăugarea de hidroxiapatită în cimenturile osoase prezintă și avantaje (crește bioactivitatea și biocompatibilitatea) dar și dezavantaje (scade elasticitatea, are tendința de a forma aglomerări în ciment). Deși fosfatul de calciu are perspective excelente în privința conductivității osoase, resorbției și biocompatibilității pentru promovarea regenerării osoase [2–4], există multe neajunsuri în legătură cu fosfatul de calciu în sine. Rezistența mecanică limitată, fragilitatea ridicată și timpul de întărire sunt cele mai importante deficiențe ale materialului, pe lângă obținerea unei rate de degradare ponderate, astfel încât acesta să poată fi utilizat numai în zone fără presiune foarte mare [4].

Cap.2 Obiectivele tezei de doctorat

Obiectivul principal al cercetărilor din prezenta teză de doctorat l-a reprezentat dezvoltarea, caracterizarea și testarea unor noi biomateriale din categoria cimenturilor osoase de tip acrilic utilizate pentru fixarea endoprotezelor de șold care să prezinte activitate antimicrobiană, prin utilizarea unor aditivi antimicrobieni (nanoparticule de argint, uleiuri esențiale, antibiotice).

Pentru îndeplinirea acestui obiectiv, au fost parcurse mai multe etape:

I. Efectuarea unei sinteze complexe privind stadiul actual al cercetărilor privind cimenturile acrilice utilizate în chirurgia ortopedică pentru fixarea endoprotezelor de șold

II. Realizarea unei analize statistice a rezultatelor clinice privind utilizarea protezelor de tip BHR, într-o clinică de ortopedie, pentru a identifica cauzele de eșec a acestora și realizarea unei analize comparative *in vitro* a cimenturilor comerciale utilizate în studiul anterior.

III. Caracterizarea fizico-chimică și efectului antimicrobian a trei uleiuri esențiale cu scopul clar definit de a demonstra eventualele proprietăți antibacteriene, ce le-ar putea dovedi a fi utilizabile la dezvoltarea unor noi cimenturilor osoase

IV. Obținerea unor noi cimenturi osoase cu proprietăți antimicrobiene.

V. Caracterizarea morfologică și structurală, evaluarea proprietăților și evaluarea activităților antimicrobiene și de biocompatibilitate a eșantioanelor experimentale de cimenturi osoase noi obținute

Cap. 3 Metode și echipamente utilizate în cercetările experimentale

3.1. Materiale utilizate și obținerea eșantioanelor experimentale

Probele experimentale au fost obținute prin modificarea componentei anorganice a unui ciment comercial pe bază de PMMA, cu vâscozitate standard, respectiv cimentul comercial "Fix 1" produs de Groupe Lépine. Drept agenți antimicrobieni, pentru ranforsarea componentei anorganice a cimentului osos, au fost utilizate nanoparticule de argint înglobate într-o sticlă ceramică (2% și 4%), respectiv hidroxiapatită impregnată cu ulei de mentă și gentamicină, fiind obținute 3 compoziții de noi cimenturi osoase. Pentru a studia efectul antimicrobian al acestora, s-au investigat probele de ciment osos cu compoziția chimică prezentată în *tabelul 3.2*.

Tabelul 3.2. Compoziția probelor din cimenturi osoase experimentale antimicrobiene

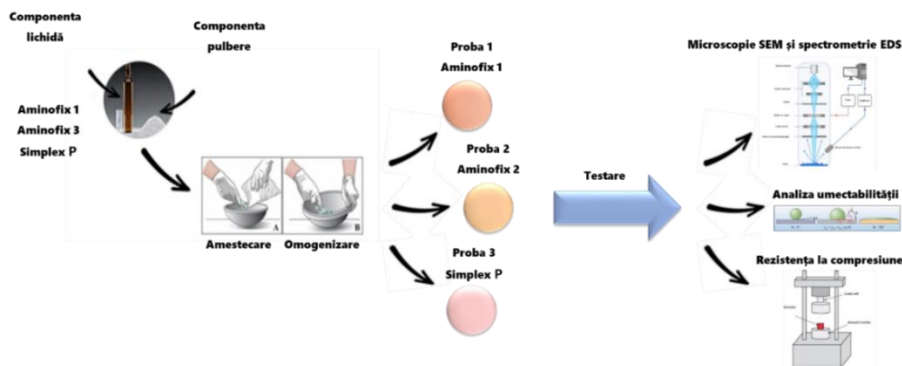
Codificare probă	Compoziție		Conținut de aditiv antimicrobian
	Pulbere	Lichid	
GM	PMMA, BPO, BaSO ₄	MMA, BMA, DmpT, HQ	0,5% gentamicină
HUM	PMMA, BPO, BaSO ₄ , HaP	MMA, BMA, DmpT, HQ	10% ulei esențial de mentă
AM1*	PMMA, BPO, BaSO ₄	MMA, BMA, DmpT, HQ	2% particule de argint
AM2*	PMMA, BPO, BaSO ₄	MMA, BMA, DmpT, HQ	4% particule de argint

*nanoparticulele de argint utilizate ca agent antimicrobian sunt încapsulate într-o matrice de sticlă ceramică

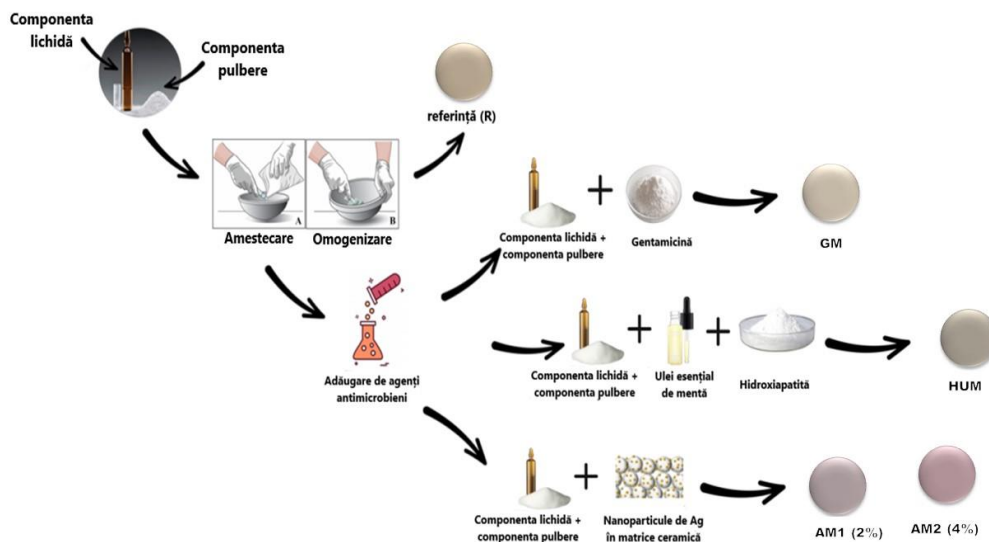
Toate trei uleiurile provin de la același producător, respectiv SC HOFIGAL IMPORT – EXPORT SA.

3.2. Metode și echipamente utilizate în cercetările experimentale

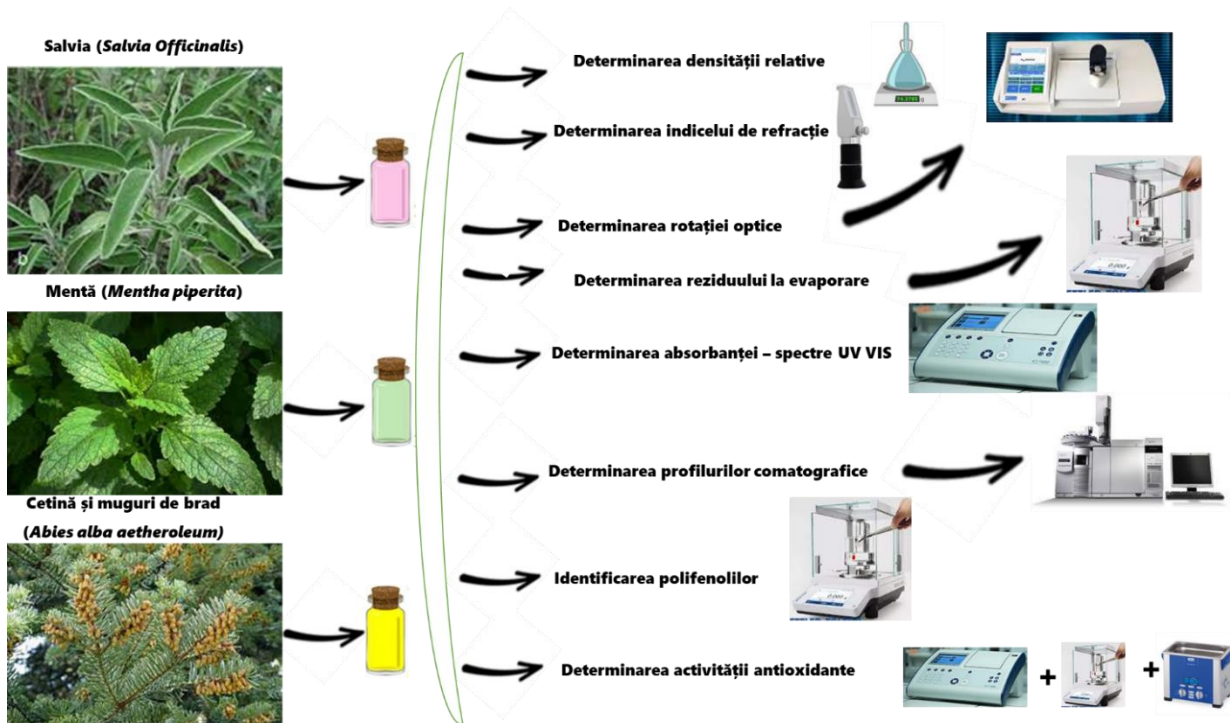
Pentru analiza comparativa in vitro a cimenturilor comerciale (Aminofix 1, Aminofix 3, Simplex P) utilizate în practica clinică pentru fixarea endoprotezelor de șold tip BHR la Spitalul Clinic Colentina București s-a efectuat caracterizarea morfologică și structurală și evaluarea proprietăților.



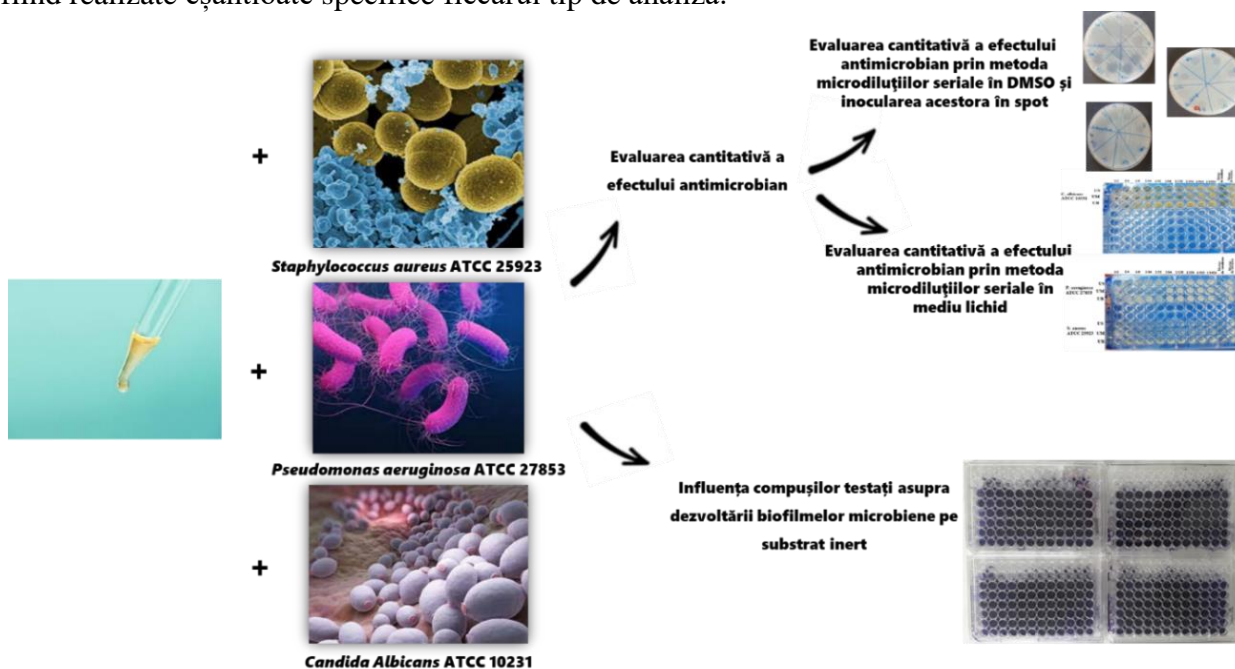
În figura de mai jos este prezentat procesul de obținere a probelor experimentale de ciment osos, la care s-au adăugat agenți antimicrobieni.



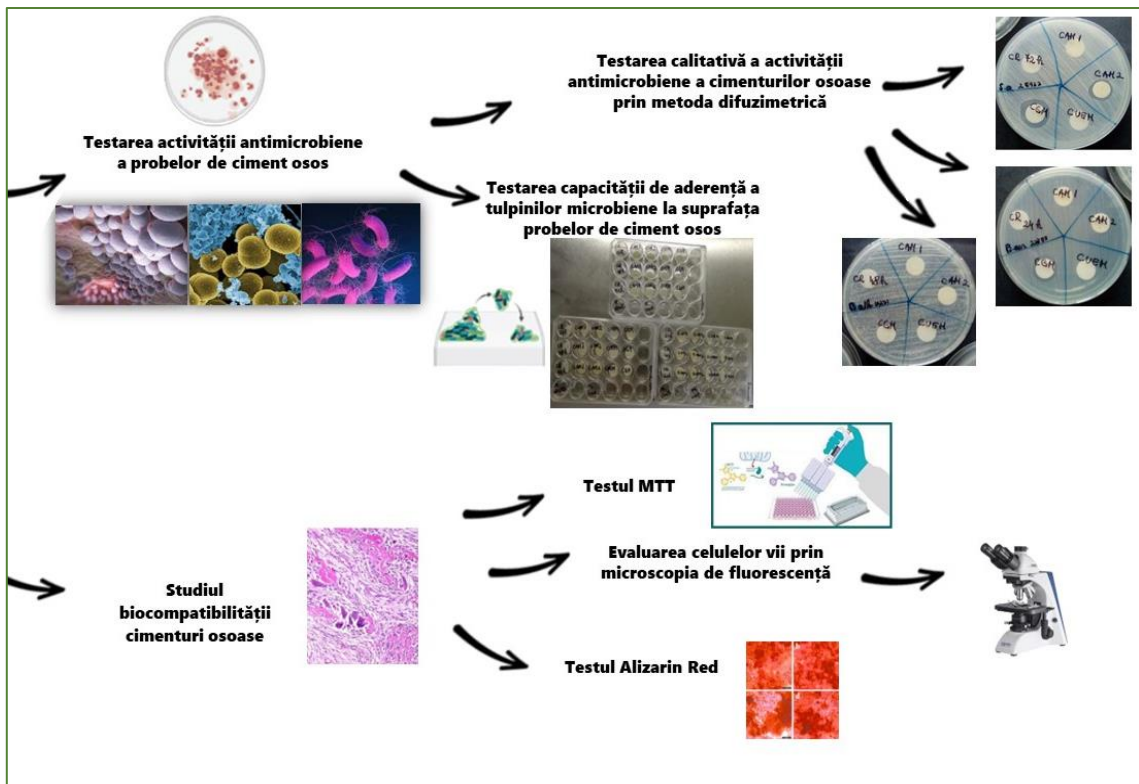
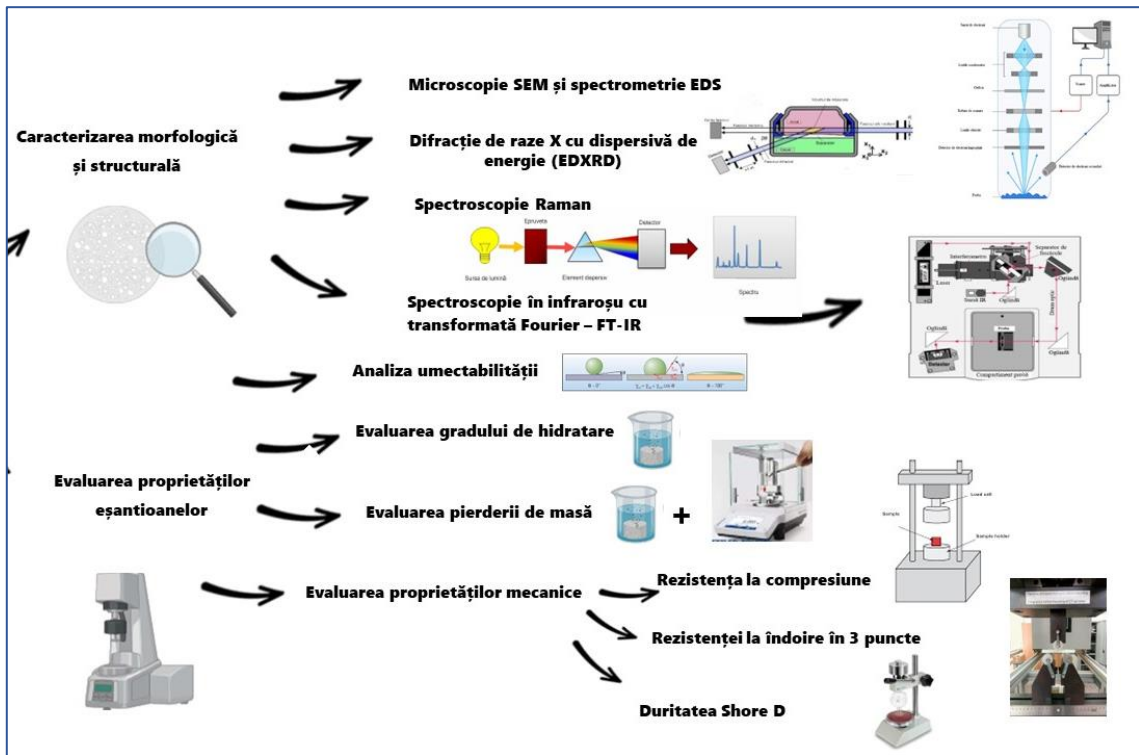
Pentru selecția unui **ulei esențial cu proprietăți antimicrobiene optime**, utilizabil la dezvoltarea unor noi cimenturi osoase s-a efectuat **caracterizarea fizico-chimică și a efectului antimicrobian**.



Probele experimentale rezultate au fost pregătite pentru caracterizarea morfologică și structurală, fiind realizate eșantioane specifice fiecărui tip de analiză.



După obținerea eșantioanelor experimentale de cimenturi osoase noi obținute, am efectuat următorul studiu, respectiv **caracterizarea morfologică și structurală** a acestora, **evaluarea proprietăților, evaluarea activităților antimicrobiene și de biocompatibilitate**.



Cap.4. Studiu de caz și cercetări experimentale privind influența cimenturilor osoase utilizate și a tehnicii de cimentare a endoprotezelor de șold tip BHR asupra eșecului acestora în practica clinică

4.1. Prezentarea problemei și a protocolului de lucru utilizat pentru rezolvarea acesteia

Eșecul protezelor de șold este o problemă care necesită investigații și analize suplimentare.

Inițial a fost realizat un studiu statistic a utilizării protezelor tip BHR în România. A fost urmărită utilizarea acestui tip de sistem în ultimii 10 - 14 ani la Spitalul Clinic Colentina, pe 300 de șolduri. În urma acestui studiu statistic a rezultat o medie de vârstă a pacienților de 45 de ani, aceștia fiind cu vârste cuprinse între 16-76 ani, cu o utilizare de 33% a acestora pentru femei. Având în vedere faptul că endoprotezele BHR sunt destinate în special pacienților de sex masculin, tineri și cu un stoc osos foarte bun, utilizarea la femei a scăzut rata de succes a acesteia. În acest studiu statistic s-a urmărit specificul patologic al pacienților pentru care s-a utilizat endoproteza, rata generală a eșecurilor fiind de aproximativ 1-4%. Cele mai multe cazuri de eșec fiind cauzate de tehnicile chirurgicale slabe, mai ales în ceea ce privește abordarea chirurgicală, orientarea implantului și creștăturile cortexului gâtului femural.

Având în vedere faptul că se știu puține lucruri despre impactul tehnicilor de cimentare asupra rezultatelor clinice ale reconstrucției șoldului, iar analizele de recuperare a reconstrucțiilor de șold eșuate arată variații mari ale grosimii mantalei cimentului și pătrunderii în capul femural, s-a analizat tipurile de ciment ortopedic utilizate la endoprotezele studiate. Medicii au utilizat cimenturile ortopedice de la următorii producători Stryker Howmedica Osteonics și Groupe Lepine. Pentru a face o analiză comparativă a celor trei tipuri de cimenturi osoase comerciale, utilizate frecvent la fixarea sistemelor tip BHR, acestea au fost pregătite în sala de operație, iar probele au fost amestecate și plasate în matrițe concomitent cu introducerea cimentului și presarea protezelor în corp de către chirurg. Manipularea cimentului a fost efectuată în mod similar cu chirurgul. Ulterior, a fost efectuată o analiză a proprietăților de manipulare, a proprietăților mecanice, a structurii și compoziție pe probe pentru a evalua factorii care influențează proprietățile și structura fiecărui ciment osos pregătit în condiții intraoperatorii.

Rezultatele arată că o manipulare deficitară poate distruge cimentul osos cu proprietăți foarte bune. De aceea se recomanda, pe cât posibil, să se evite amestecarea manuală.

4.2. Identificarea cauzelor de eșec ale endoprotezelor de șold tip BHR prin analize de microscopie

Au fost prelevate trei proteze de șold eșuate de la Spitalul Clinic Colentina din București și au fost analizate din punct de vedere al interfeței cimentului osos cu biomaterialul metalic.

Utilizând sistemul atribuit lui DeLee și Charnley și Gruen [5,6], care au împărțit acetabulul în trei zone egale, am creat o schiță (*Figura 4.6.*) pentru a stabili principalele zone de interes atunci când este aplicată pe secțiunea transversală a unui BHR explantat (principalele zone de interes: Zona 1 - zona superioară; Zona 2 - zona intermediană; Zona 3 - zona radială).

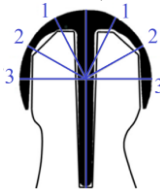


Figura 4.6. Regiunile de interes (1-3) utilizate pentru analiza grosimii și penetrării cimentului

Au fost făcute măsurători ale mantalei de ciment și ale gradului de pătrundere. Cu ajutorul programului “Image J” s-au măsurat dimensiunile grosimii mantalei de ciment în cele 3 zone de interes, circumferința și perimetrul cupei acetabulare.

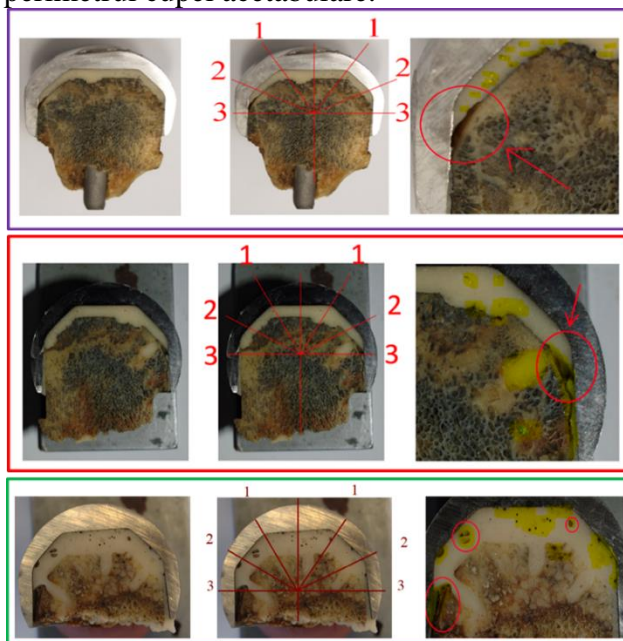


Figura 4.7. Secțiuni longitudinală prin explante de tip endoproteza de șold BHR a probelor 1, 2 și 3 (stânga), raportarea zonelor de interes 1-3 la secțiunea longitudinală (mijloc) și evidențierea defectelor (dreapta)

Zona 1 este supraîncărcată, iar osul se afla la o distanță prea mare de cupa acetabulară. La proba 2 este vizibilă cu ochiul liber neuniformitatea cu care este aplicată mantaua de ciment, iar grosimea acesteia este inadecvată. La proba 3 mantaua de ciment ortopedic depășește cu mult dimensiunile optime în unele zone. S-au format bule de aer din cauza amestecării necorespunzătoare, iar cimentul a pătruns în os. Straturile mult prea groase de ciment evidențiate au valorile de aproximativ 14 mm, comparativ cu 2 mm conform literaturii de specialitate. Putem presupune că pătrunderea în os a cimentului ortopedic este cauzată de vâscozitatea scăzută a acestuia. Prin mărirea imaginii (dreapta) remarcam goluri și resturi metalice.

În urma investigațiilor de microscopie electronică de baleiaj (SEM), din toate probele se observă: lipsa de adeziune a interfeței ciment – metal, defectele existente în cimentul osos, lipsa de adeziune la nivelul mantalei de ciment, lipsa omogenității cimentului osos cu aglomerări de material datorată probabil manipulării defectuoase a acestuia.

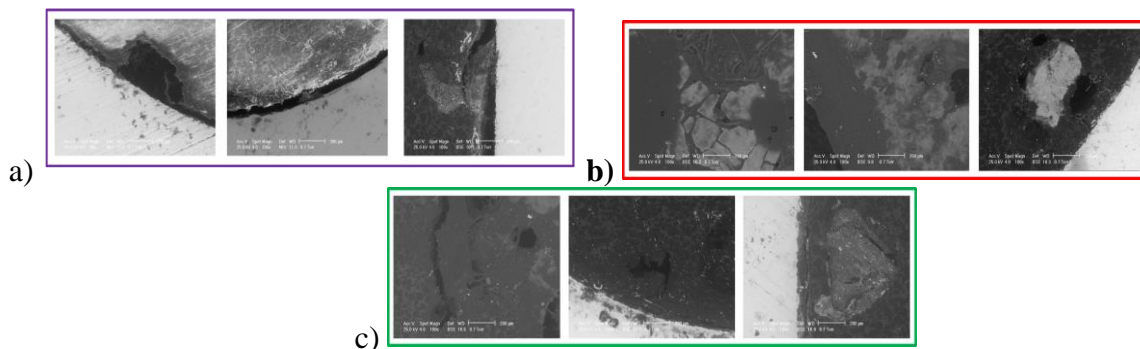


Figura 4.10 Imagini reprezentative SEM a neuniformităților existentelor la interfața ciment osos – proteză la probele 1 (a), 2 (b) și 3 (c) - la mărire de 100X

Analizele efectuate au pus în evidență faptul că eșecurile nu sunt datorate execuției protezei sau a principiului de funcționare al acesteia, ci a mai multor aspecte ca: selecția pacienților, **tipul de ciment utilizat, tehnica deficitară de preparare și utilizarea inadecvată a cimenturilor osoase**, tehnicile chirurgicale slabe, în special în ceea ce privește abordarea chirurgicală, orientarea implantului și creștăturile cortexului gâtului femural.

4.3. Analiza comparativă *in vitro* a cimenturilor comerciale (Aminofix 1, Aminofix 3, Simplex P) utilizate în practica clinică pentru fixarea endoprotezelor de șold tip BHR la o clinică de ortopedie

Eșecul protezelor de șold este o problemă care necesită investigații și analize suplimentare. Pentru a determina dacă eșecul endoprotezelor de șold de tip BHR analizate poate fi legată de tehnica de cimentare, am făcut o analiză comparativă a trei tipuri de cimenturi osoase comerciale, care au fost pregătite în sala de operație – în condiții similare cu cele utilizate la explantele analizate. Probele au fost amestecate și plasate în epruvete special pregătite, concomitent cu introducerea cimentului și presarea protezelor în corp de către chirurg. Manipularea cimentului a fost efectuată în mod similar cu chirurgul și simultan cu acesta. În această lucrare de doctorat a fost efectuată o analiză a proprietăților de manipulare, a proprietăților mecanice, a structurii și compoziție pe probe pentru a evalua factorii care influențează proprietățile finale și structura fiecărui ciment osos în condiții intraoperatorii. Rezultatele arată că o manipulare proastă poate distruge cimentul osos cu proprietăți foarte bune. De aceea se recomandă, pe cât posibil, să se evite amestecarea manuală.

4.3.1. Rezultate experimentale de microscopie electronică de baleiaj SEM și spectrometrie EDS

Analiza SEM a fost efectuată pentru a evalua structura probelor experimentale și a releva prezența unor potențiale aglomerări care ar putea afecta omogenitatea acesteia. Compoziția elementală a probelor a fost determinată prin analiza EDS. Imaginile SEM au evidențiat microstructuri tipice pentru cimenturile pe bază de PMMA: granulele din pulberea de polimer, matricea monomerului polimerizat, elementul radiopacifiant, în acest caz, sulfatul de bariu (BaSO_4) și porii.

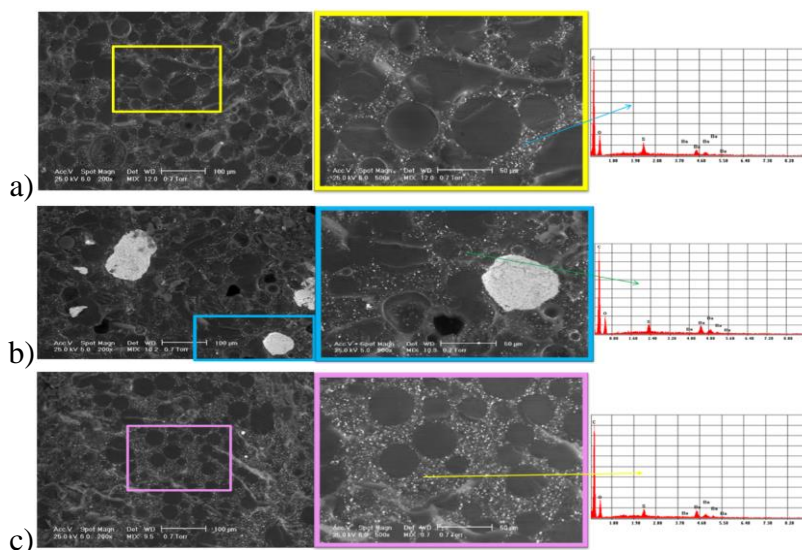


Figura 4.15. Imagini SEM reprezentative și spectre EDS corespunzătoare ale probei 1 (a), a probei 2 (b) și a probei 3 (c) investigate

În schimb, pentru proba 2, imaginile SEM evidențiază aglomerări ale elementului de radioopacifiere din cauza amestecării necorespunzătoare a componentelor cimentului. Structura cea mai omogenă a fost observată pentru proba 3. Analiza EDS a confirmat compoziția cimentului osos comercial și evidențiază prezența C și O din cele două faze polimerice (elemente majoritare) și Ba și S din compoziția elementului de radioopacifiere.

Ca o primă concluzie, recomandăm pentru acest tip de ciment amestecarea centrifugă și evitarea amestecării manuale a cimentului. În ceea ce privește semnificația clinică a rezultatelor prezentate în această secțiune, putem menționa că amestecarea este o etapă foarte importantă în prepararea cimentului osos. Dacă cimenturile osoase nu sunt bine amestecate, aglomerările ar putea apărea în structură cu o influență puternică asupra proprietăților mecanice.

4.3.2. Rezultate experimentale privind umectabilitatea cimenturilor

Starea hidrofilă/hidrofobă a materialelor oferă informații despre biocompatibilitatea acestuia deoarece proprietățile suprafeței influențează puternic interfața biomaterial-țesut.

O suprafața hidrofilă reflectă o bună umectabilitate și aderență, deci o mai bună osteointegrare.

Rezultatele obținute indică faptul că suprafețele probelor au fost hidrofiele.

O valoare optimă a unghiului de contact pentru aderența celulară este de aproximativ 55° , cea mai apropiată valoare măsurată în această cercetare fiind obținută în cazul probei 3 ($55,1^\circ$) urmată de proba 1 și proba 2.

Imaginile unghiului de contact corespunzătoare pentru fiecare probă investigată sunt prezentate în și în Figura 4.16.

Figura 4.16. Imagini cu picături de lichid pe suprafața materialelor: proba 1 (galben), proba 2 (albastru), proba 3 (roz)

Valorile unghiului de contact pentru probele investigate au fost foarte apropiate unele de altele variind între 55 și 61 de grade. Rezultatele obținute indică faptul că suprafețele probelor au fost hidrofiele. O suprafață hidrofilă reflectă o bună umectabilitate și aderență, deci o mai bună osteointegrare. O valoare optimă a unghiului de contact pentru aderența celulară este de aproximativ 55° [7,8], cea mai apropiată valoare măsurată în această cercetare fiind obținută în cazul probei 3 ($55,1^\circ$) urmată de proba 1 și proba 2.

4.3.3. Rezultate experimentale privind proprietățile mecanice ale cimenturilor

Determinarea rezistenței mecanice la compresiune

Aspectul probelor înainte și după efectuarea testului de compresiune este prezentat în Figura 4.17. Pentru fiecare ciment osos investigat am utilizat trei eșantioane (cu excepția probei 1 pentru care s-au folosit 4 eșantioane), fiecare având forma unui cilindru.

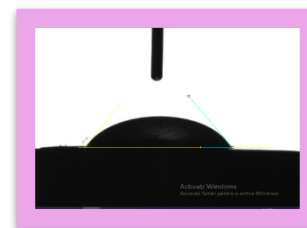
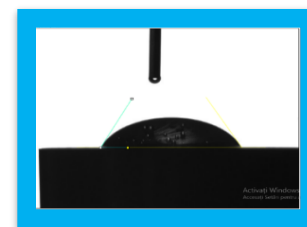
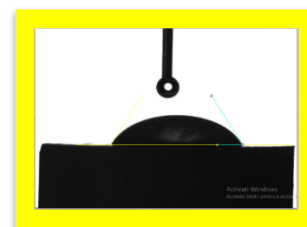




Figura 4.17. Imagine a probelor 1 (galben), 2 (albastru) și 3 (roz), înainte și după încercarea de rezistență la compresiune (înainte de compresiune - stânga, după comprimare - dreapta)

În urma testului de compresiune, software-ul generează automat diagrama comparativă pentru toate probele testate (Figura 4.19).

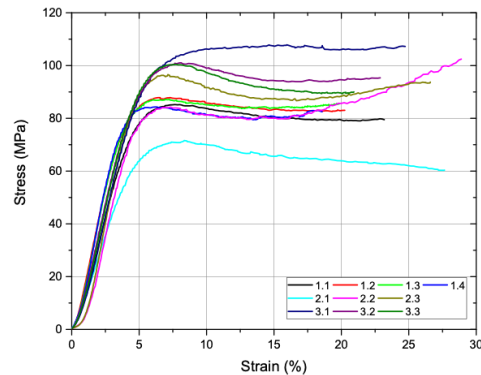


Figura 4.19. Diagrama comparativă pentru încercarea la compresiune

Din figura 4.19 putem observa, în urma testului de compresiune, un comportament ductil pentru toate probele investigate. Valorile numerice după testul de compresiune efectuat pe probele investigate sunt prezentate în Tabelul 4.9.

Din valorile obținute pentru rezistența la compresiune s-a observat că toate cimenturile osoase investigate au îndeplinit valoarea minimă stabilită de standardul ASTM F451 (70 MPa). Cea mai bună valoare a fost înregistrată de proba 3, o medie de 92,94 MPa, urmată de proba 1 (78,81 MPa) și proba 2 (77,55 MPa). În ceea ce privește modulul de elasticitate al probelor investigate, valorile sunt apropiate. Modulul mediu de elasticitate al probelor 1 este de $2433,75 \pm 263,68$ MPa. Pentru probele 2, modulul de elasticitate are valoarea medie de $2265,47 \pm 582,60$ MPa, iar pentru probele 3, valoarea medie a fost de $2308,03 \pm 32,15$ MPa. Tensiunea maximă reprezintă cea mai mare valoare a tensiunii înregistrată în timpul încercării și are valori similare pentru cele două tipuri de ciment fabricate de același producător (~ 85 MPa).

Am realizat grafice comparative cu valorile obținute ale modulului de elasticitate, limitei de curgere și tensiunii maxime pentru cele trei tipuri de ciment ortopedic (Figura 4.20).

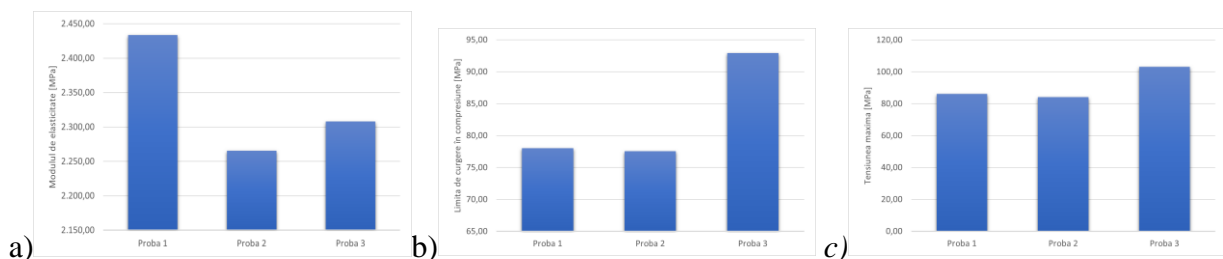


Figura 4.20. Grafic comparativ pentru modulul de elasticitate (a), pentru limita de curgere în compresiune (b) și pentru tensiunea maxima (c)

Determinările de stereomicroscopie pentru cimenturile ortopedice au fost realizate pentru cele trei tipuri de probe ale căror aspect a prezentat defecte de material radicale în urma încercărilor mecanice. În imaginea obținută pentru prima probă (*Figura 4.21.a*) se remarcă cu ușurință prezența porozităților. De asemenea, în urma încercărilor mecanice la compresiune s-a format o fisură în zona mediană. Pentru zona marcată în imagine cu 2, se remarca un defect format la prepararea cimentului.

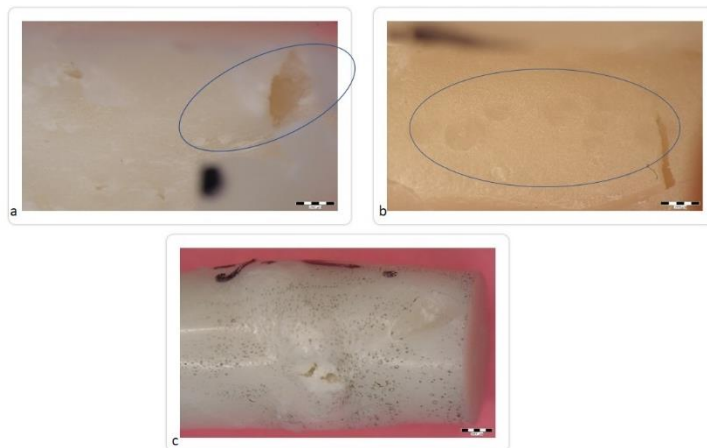


Figura 4.21. Imagine de stereomicroscopie pentru proba 1 (a), proba 2 (b) și proba 3 (c)

Pentru cea de-a doua probă, (*Figura 4.21.b*), paralel cu direcția de solicitare s-a format o fisură care se ramifică. De asemenea s-au format și fisuri perpendiculare cu direcția de solicitare mecanică. Se remarcă și o zonă de rupere cu aspect "în trepte", similar cu aspectul ruperii prin clivaj. Vâscozitatea joasă a acestui tip de ciment amplifică formarea de fisuri. În această imagine se evidențiază zona de rupere cu aspect "vale de rau" ce se continuă cu fisura în material și se observă goluri de forma circulară. În *Figura 4.21.c* se evidențiază aspectul poros al probei și aspectul pe care l-a obținut proba în urma efectului de butoiere însoțit de zone de curgere a materialului. Efectul de butoiere apare în urma încercării mecanice de compresiune. Materialul se deformează în zona fisurii.

4.4. Concluzii

Probele investigate au prezentat o structură și morfologie tipică pentru cimenturile osoase de tip acrilic, cu tendința de a forma aglomerări, în cazul probei 2, din cauza amestecării necorespunzătoare a cimentului. Umectabilitatea măsurată prin determinarea unghiului de contact indică o hidrofilicitate a probelor investigate. Din punct de vedere al proprietăților mecanice toate probele investigate prezintă valori optime în conformitate cu standardul ASTM F451, cea mai bună rezistență la compresiune obținându-se pentru proba 3.

Din rezultatele obținute putem spune că procesul de manipulare a cimentului (etapa de amestecare, etapa de așteptare, etapa de lucru) are un rol important asupra structurii și proprietăților mecanice ale cimenturilor osoase și se recomandă evitarea mixării manuale pentru cimenturile osoase cu vâscozitate scăzută.

Cap.5. Studiu de caz și cercetări experimentale privind selecția unui ulei esențial cu proprietăți antimicrobiene optime, utilizabil la dezvoltarea unor noi cimenturilor osoase antimicrobiene

Având în vedere necesitatea de a descoperi și dezvolta noi modalități de a combate infecțiile postoperatorii și pornind de la faptul că natura este cel mai bun generator de soluții am efectuat caracterizarea fizico-chimică și antimicrobiană a unui număr de 3 uleiuri esențiale, pentru a determina potențialul lor în raport cu necesitatea existentă.

Cele trei uleiuri esențiale testate în cadrul prezentei teze de doctorat au fost:

- **US - Ulei esențial de salvie – *Salvia officinalis***
- **UM - Ulei esențial de mentă – *Mentha piperita aetheroleum***
- **UB - Ulei esențial de brad – *Abies alba aetheroleum***

Toate trei uleiurile provin de la același producător, respectiv SC HOFIGAL IMPORT – EXPORT SA.

5.1. Caracterizarea fizico - chimică a uleiurilor esențiale testate

Uleiurile esențiale sunt în esență uleiuri naturale, obținute prin distilare și având un miros distinctiv, al plantei sau altor surse din care este extras. Multe componente ale uleiurilor esențiale ale aceleiași plante pot fi extrase din diferite părți ale plantelor cu proprietăți complet diferite. Acestea sunt produse folosind diferite metode, distilarea cu abur fiind metoda cea mai întâlnită, în timp ce alte metode, cum ar fi extracția mecanică, extracția cu solvenți sau extracția cu fluide supercritice sunt mai puțin utilizate. Componentele principale ale acestor uleiuri sunt terpenoidele, urmate de diterpeni și compuși aromatici.

Până în prezent, nu există suficiente studii care să ne poată oferi o idee clară cu privire la modul de acțiune al uleiurilor esențiale. Având în vedere complexitatea compoziției lor chimice, totul sugerează că acest mod de acțiune este complex și este dificil de identificat calea moleculară de acțiune. Este foarte probabil ca fiecare dintre componentele uleiurilor esențiale să aibă propriul mecanism de acțiune.

Scopul acestor analize a fost evaluarea efectului antimicrobian manifestat de trei uleiuri esențiale (ulei esențial de brad, de mentă și de salvie) asupra capacității de creștere, multiplicare și generare de biofilme monospecifice a trei tulpini microbiene standard: o tulpină Gram negativă (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853), o tulpină Gram pozitivă (*Staphylococcus aureus* ATCC25923), o tulpină levurică (*Candida albicans* ATCC10231).

Pentru fiecare dintre uleiurile esențiale analizate s-a determinat: densitatea relativă, indicele de refracție, rotația optică, reziduul la evaporare, solubilitatea, spectrele UV-VIS, profilul cromatografic prin GC-MS, s-a realizat identificarea polifenolilor, iar rezultatele sunt prezentate în tabelele și figurile următoare:

Tabelul 5.1. Densitatea relativă a uleiurilor esențiale studiate:

Probă	Ulei esențial de salvie	Ulei esențial de mentă	Ulei esențial de brad
Densitate relativă	0,890-0,908	0,900 – 0,916	0,855 – 0,875

Tabelul 5.2. Indicele de refracție a uleiurilor esențiale studiate:

Probă	Ulei esențial de salvie	Ulei esențial de mentă	Ulei esențial de brad
Indice de refracție	1,456-1,466	1,457 – 1,467	1,475 – 1,481

Tabelul 5.3. Rotația optică a uleiurilor esențiale studiate:

Probă	Ulei esențial de salvie	Ulei esențial de mentă	Ulei esențial de brad
Rotația optică	-26,0° - -10,0°	-30° - -10°	-15° - +5°

Tabelul 5.4. Reziduu la evaporare al uleiurilor esențiale studiate:

Probă	Ulei esențial de salvie	Ulei esențial de mentă	Ulei esențial de brad
Reziduu la evaporare	max. 1,5%	max. 1,5%	max. 1,5%

Solubilitatea. Uleiurile esențiale sunt în general lipofile și nemiscibile cu apa. Se pot dilua cu solvenți puri ca alcool și polietilenglicol, iar pentru aplicații topice cel mai sigur este să fie diluate în uleiuri grase. Uleiurile esențiale sunt în general solubile în solvenți organici ca: alcool etilic, acetonă, hexan, cloroform, benzen, eter, etc.

Absorbanța – spectre UV-VIS

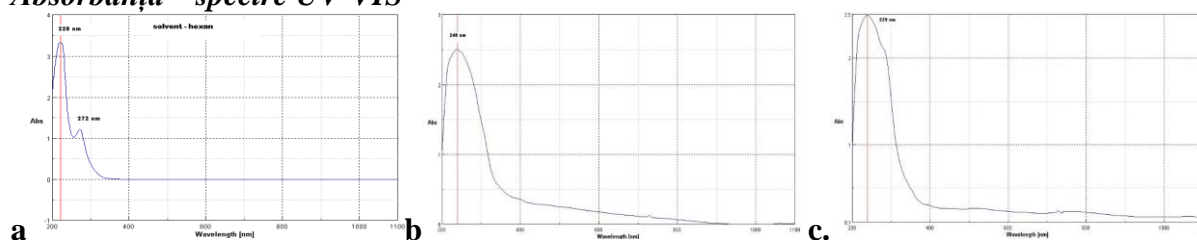


Figura 5.1. Spectrele uleiurilor esențiale de salvie(a), de mentă (b) și de brad (c) în hexan

Profilurile cromatografice ale celor trei uleiuri analizare sunt prezentate în figura 5.2 și în tabelele 5.5, 5.6 și 5.7.

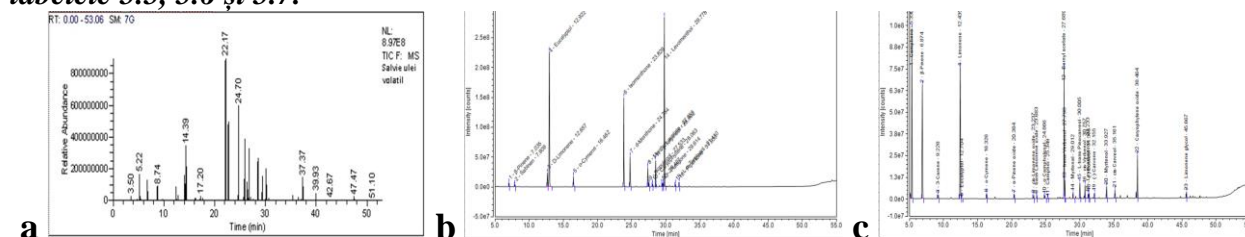


Figura 5.2. Profilurile cromatografice ale celor trei uleiuri esențiale de salvie (a), mentă (b) și brad (c)

Identificarea polifenolilor. Pentru toate uleiurile studiate s-a înregistrat apariția colorației albastre, ceea ce indică prezența polifenolilor.

5.2. Evaluarea efectului antimicrobian a uleiurilor esențiale testate

Evaluarea calitativă a efectului antimicrobian prin metoda microdiluțiilor seriale în DMSO și inocularea acestora în spot

Citirea rezultatelor s-a efectuat prin aprecierea clarității zonei de inhibiție și notarea diluției de lucru până la care s-a observat apariția acestei zone.

Disponerea diluțiilor de ulei esențial pe suprafața mediului solid inoculat anterior la temperatura prestabilită a evidențiat apariția unor zone de inhibiție care au permis stabilirea valorii CMI. Astfel, pentru tulpina Gram pozitivă *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 valoarea CMI a fost cea corespunzătoare diluției 1/4 pentru uleiul esențial de salvie și brad și 1/8 pentru uleiul de mentă (figura 5.3 A, B, C).

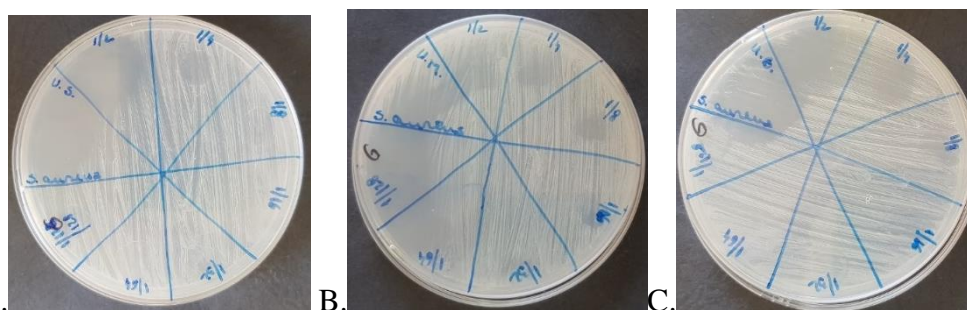


Figura 5.3 Aspectul zonei de inhibiție manifestată de diferitele diluții de uleiuri esențiale față de tulpina Gram pozitivă *Staphylococcus aureus* ATCC25923 (A-ulei de salvie, B-ulei de mentă, C-ulei de brad)

Pentru tulpina Gram negativă *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 valoarea CMI a fost cea corespunzătoare diluției 1/128 pentru uleiul esențial de salvie și brad și 1/128+ pentru **uleiul de mentă** (figura 5.4 A, B, C).



Figura 5.4 Aspectul zonei de inhibiție manifestată de diferitele diluții de esențiale esențiale față de tulpina Gram negativă *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 (A-ulei de salvie, B-ulei de mentă, C-ulei de brad)

Pentru tulpina levurică *Candida albicans* ATCC102310 valoarea CMI a fost cea corespunzătoare diluției 1/128 pentru **toate uleiurile esențiale** testate (figura 5.5 A, B, C), fiind cea mai sensibilă tulpină din cele 3 studiate.

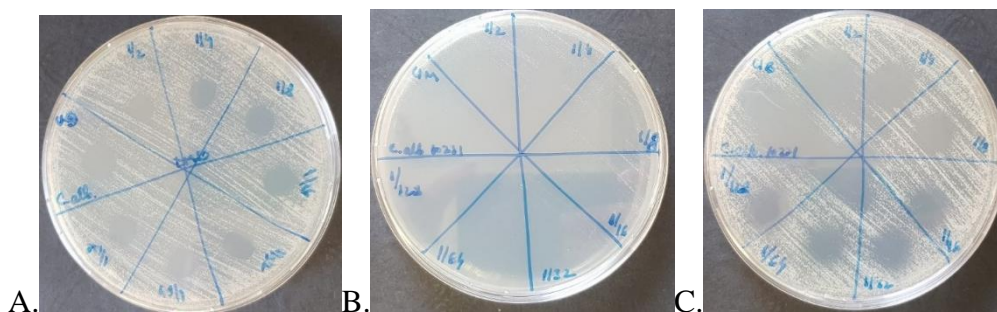


Figura 5.5 Aspectul zonei de inhibiție manifestată de diferitele diluții de uleiuri esențiale față de tulpina levurică *Candida albicans* ATCC 10231 (A-ulei de salvie, B-ulei de mentă, C-ulei de brad)

Evaluarea cantitativă a efectului antimicrobian prin metoda microdiluțiilor seriale în mediu lichid

Pentru determinarea valorilor concentrației minime inhibitorii (CMI) reprezentată de cantitatea cea mai mică de ulei esențial capabilă să inhibe creșterea și multiplicarea celulelor microbiene, după incubarea plăcilor la temperatura prestabilită timp de o zi, au fost analizate rezultatele obținute prin observare macroscopică și citire spectrofotometrică la 620 nm.

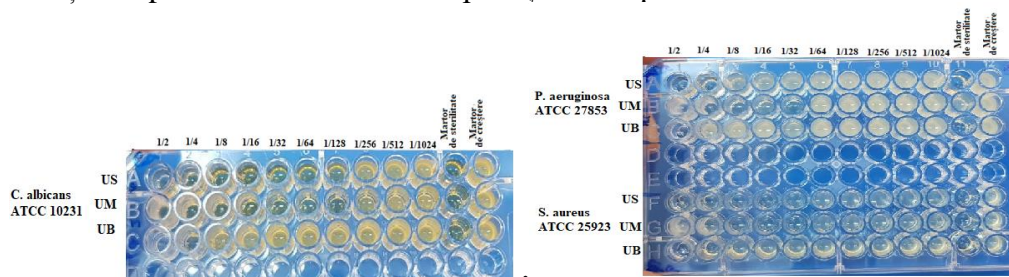


Figura 5.6 Schema de realizare a diluțiilor binare serialele compuşilor testați și aspectul creșterii microbiene după etapa de incubare, în vederea determinării valorilor CMI.

Diluția de compus corespunzătoare ultimului godeu în care nu s-a mai observat dezvoltarea culturii a reprezentat valoarea CMI pentru compusul respectiv (figura 5.6). În godeurile următoare, inclusiv godeul martor de creștere, mediul a fost tulbure datorită multiplicării celulelor microbiene. Godeul martor de sterilitate nu a prezentat creștere bacteriană, conținutul lichid fiind clar și transparent. Rezultatele testelor realizate în mediu lichid nu sunt în totalitate în concordanță cu rezultatele testelor pe mediu solid, probabil deoarece uleiurile esențiale testate nu au fost miscibile cu mediul lichid în care s-au realizat diluțiile seriale binare (tabel 5.8.).

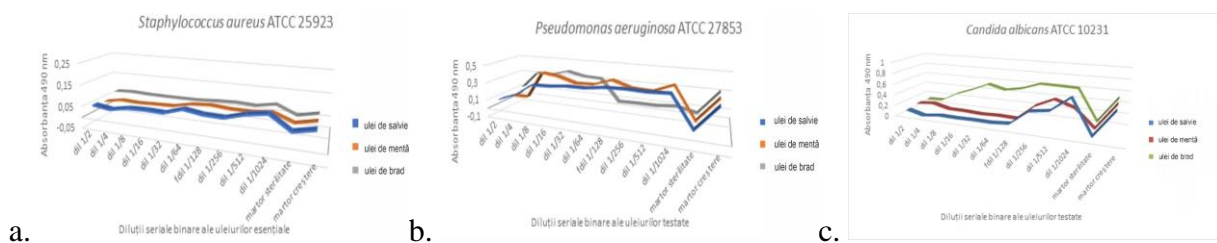
Tabelul 5.8. Valorile CMI obținute prin metoda diluțiilor seriale binare în mediu lichid

Tulpina bacteriană/uleiuri esențiale	Valoarea CMI exprimată sub formă de diluții		
	Ulei esențial de salvie (US)	Ulei esențial de mentă (UM)	Ulei esențial de brad (UB)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	dil. 1/4	dil. 1/8	dil. 1/4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853.	dil. 1/128	dil. 1/128	dil. 1/128
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	dil. 1/128	dil. 1/128	dil. 1/128

Prin urmare, pentru această categorie de probe, determinarea valorilor CMI trebuie realizate prin mai multe metode alternative care să permită o evaluare cât mai corectă a eficienței activității antimicrobiene.

Studiul influenței compuşilor testați asupra dezvoltării de biofilme microbiene pe substrat inert

Testarea proprietăților uleiurilor esențiale de a inhiba aderența celulelor bacteriene la substrat inert și generarea de biofilme monospecifice a permis stabilirea valorilor Concentrației minime de Eradicare a Biofilmului (CMEB) [9–11] Aceste valori sunt reprezentate de cele mai mari diluții de ulei care au inhibat aderența și sunt reprezentate în graficele de mai jos (figurile 5.7, 5.8 și 5.9).



a. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
 b. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
 c. *Candida albicans* ATCC 10231

Figura 5.7 Reprezentarea grafică a valorilor CMEB pentru tulpina Gram pozitivă *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, valori stabilite în funcție de absorbanța la 490 nm (a), pentru tulpina Gram negativă *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, valori stabilite în funcție de absorbanța la 490 nm (b) și pentru tulpina levurică *Candida albicans* ATCC 10231 valori stabilite în funcție de absorbanța la 490 nm (c)

În mare parte, valorile CMEB sunt similare cu cele CMI, excepție făcând uleiul esențial de brad care se pare ca a stimulat aderența tulpinii levurice la diluții mai mari de 1/32 (figura 5.10).

5.3. Concluzii rezultate în urma caracterizării fizico - chimice și antimicrobiene a celor trei uleiuri esențiale analizate

Ca urmare a caracterizărilor fizico - chimice și antimicrobiene a celor trei uleiuri esențiale analizate a rezultat că cea mai bună opțiune pentru modificarea componentei anorganice a unui ciment comercial pe bază de PMMA, cu vâscozitate standard o reprezintă uleiul esențial de mentă *Mentha piperita*.

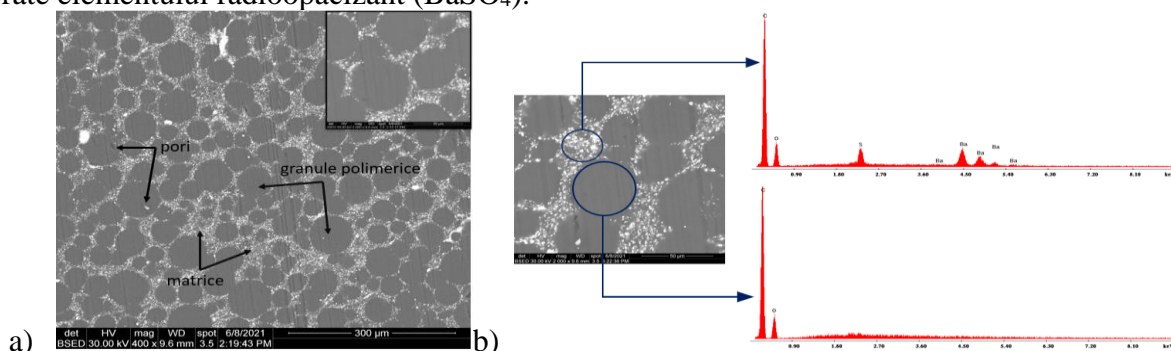
Cap.6 Caracterizarea și testarea unor noi cimenturi osoase cu proprietăți antimicrobiene

6.1. Caracterizarea morfologică și structurală

6.1.1. Determinări experimentale de microscopie electronică de baleiaj (SEM) cuplată cu spectroscopie de raze X cu dispersie după energie (EDS)

Rezultatele determinărilor de microscopie electronică de baleiaj cuplată cu spectroscopia de raze X cu dispersie după energii sunt prezentate în figurile următoare.

Imaginea SEM pentru proba de referință (figura 6.1.) prezintă o structură omogenă în care se evidențiază patru faze: granule din pulberea polimerică; pori; monomerul polymerizat și elementul radioopacizant, în acest caz sulfatul de bariu ($BaSO_4$). Granulele din pulberea polimerică sunt suprafețe circulare întunecate în care sunt incluși porii. Monomerul polymerizat și sulfatul de bariu formează o matrice care înconjoară granulele polimerice. Punctele albe, strălucitoare sunt datorate elementului radioopacizant ($BaSO_4$).



a) *det HV mag WD spot 6/8/2021 300 μm*
 b) *BSED 30.00 kV 400 x 9.6 mm 3.5 2:19:43 PM*

Figura 6.1. Imagine SEM a probei de referință R (400 X) a) și Imagine SEM reprezentativă (2000 X) și analiza EDX realizată pe diferite zone pentru proba de referință R

Analiza elementală locală efectuată prin spectroscopie de raze X cu dispersie după energie (EDS), prezentată în figura 6.2., evidențiază prezența elementelor majoritare, C și O, din cele două faze de polymer (granule pre-polymerizate și monomer polymerizat) și a elementelor Ba și S din compoziția elementului radioopacizant (sulfatul de bariu prezent în matricea de monomer polymerizat).

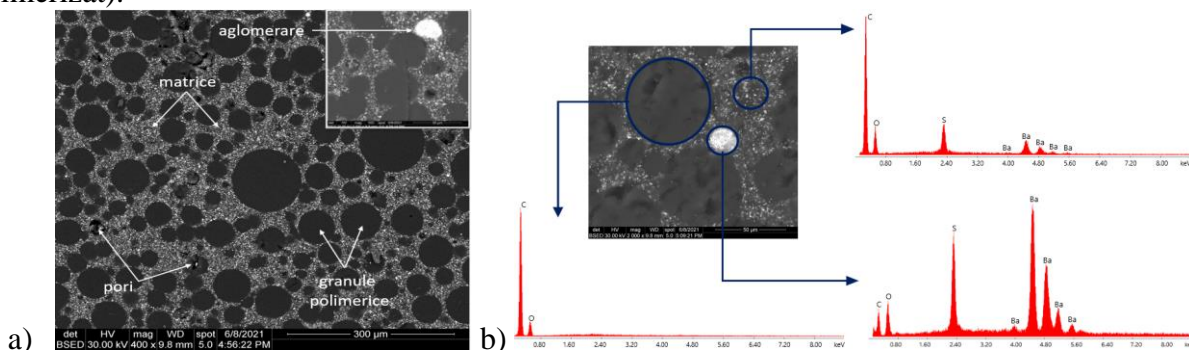


Figura 6.3. Imagine SEM a probei GM (400 X) a) și Imagine SEM reprezentativă (2000 X) și analiza EDX realizată pe diferite zone pentru proba GM

Imaginea SEM pentru proba GM ce conține gentamicină evidențiază o structură relativ omogenă și prezența unor aglomerări a elementului radioopacizant (așa cum rezultă din spectrul EDS, realizat în zona respectivă – figura 6.3 b), apărute în urma unui proces de omogenizare necorespunzător. De asemenea, în figura 6.3., se evidențiază cele patru faze specifice unui ciment osos pe bază de PMMA: granule din pulberea polimerică; pori; monomerul polymerizat și elementul radioopacizant.

Analiza elementală locală evidențiază și în acest caz prezența elementelor majoritare, C și O, din cele două faze de polymer (granule pre-polymerizate și monomer polymerizat) și a elementelor Ba și S din compoziția elementului radioopacizant (sulfatul de bariu prezent în matricea de monomer polymerizat).

Rezultatele analizei SEM pentru proba HUM sunt prezentate în figura 6.5. Se observă o structură relativ omogenă și prezența unor mici zone de aglomerări a hidroxiapatitei în matricea de monomer polymerizat (așa cum se evidențiază în spectrul EDS din figura 6.6.). Alături de aceste zone de neomogenități structurale, se mai poate observa granulele din pulberea polimerică și matricea de monomer polymerizat în care este înglobat elementul radioopacizant ($BaSO_4$).

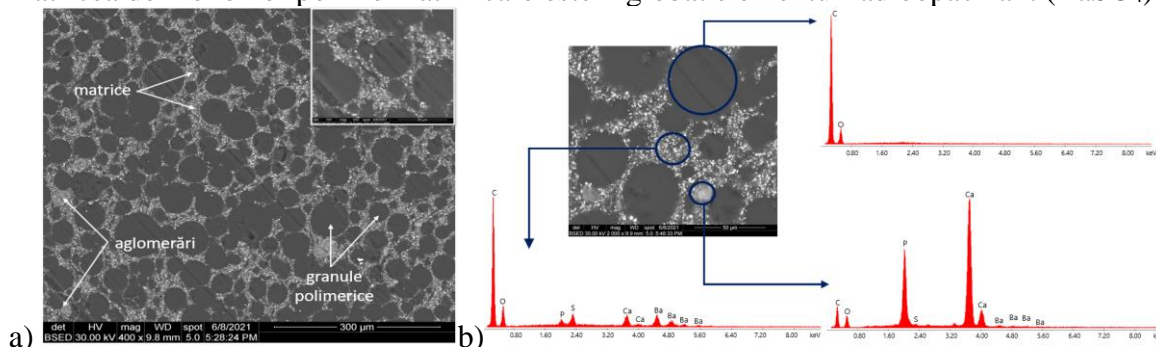


Figura 6.5. Imagine SEM a probei HUM (400 X) a) și Imagine SEM reprezentativă (2000 X) și analiza EDX realizată pe diferite zone pentru proba HUM b)

În spectrele EDS corespunzătoare, (figura 6.6.), se evidențiază prezența elementelor majoritare, C și O, din cele două faze de polymer (granule pre-polymerizate și monomer polymerizat), a elementelor Ba și S din compoziția elementului radioopacizant și a elementelor P

și Ca din compoziția hidroxiapatitei. Deoarece uleiul esențial de mentă este format din compuși organici din clasa terpenelor și alcoolilor (elemente chimice: C, O și H), spectrele EDS nu evidențiază prezența altor elemente chimice.

Rezultatele SEM pentru proba AM1 ce conține 2% nanoparticule de argint înglobate într-o matrice de sticlă ceramică (figura 6.7.) prezintă mici zone în care s-au format aglomerări ale agentului antimicrobian în matricea de monomer polymerizat. De asemenea se evidențiază pori, monometrul pre-polymerizat și matricea caracteristică cimenturilor osoase din PMMA.

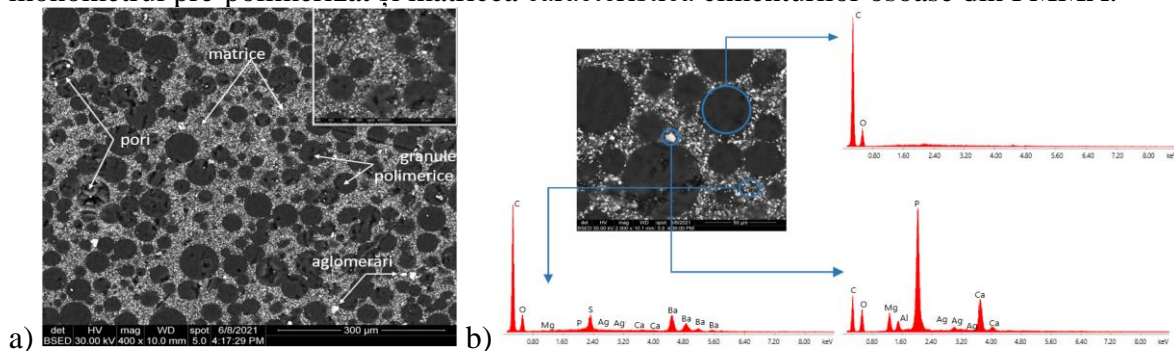


Figura 6.7. Imagine SEM a probei AM1 (400 X) a) și Imagine SEM reprezentativă (2000X) și analiza EDX realizată pe diferite zone pentru proba AM1

În spectrele EDS (figura 6.8.) se evidențiază prezența elementelor majoritare, C și O, din cele două faze de polimer (granule pre-polymerizate și monomer polymerizat), a elementelor Ba și S din compoziția elementului radioopacizant și a elementelor Ag, P, Ca și Mg din compoziția agentului antimicrobian.

Spre deosebire de proba AM1, în imaginile SEM obținute pentru proba AM2 (4% agent antimicrobian), (figura 6.9.) se observă formarea unor aglomerări cu dimensiuni mai mari.

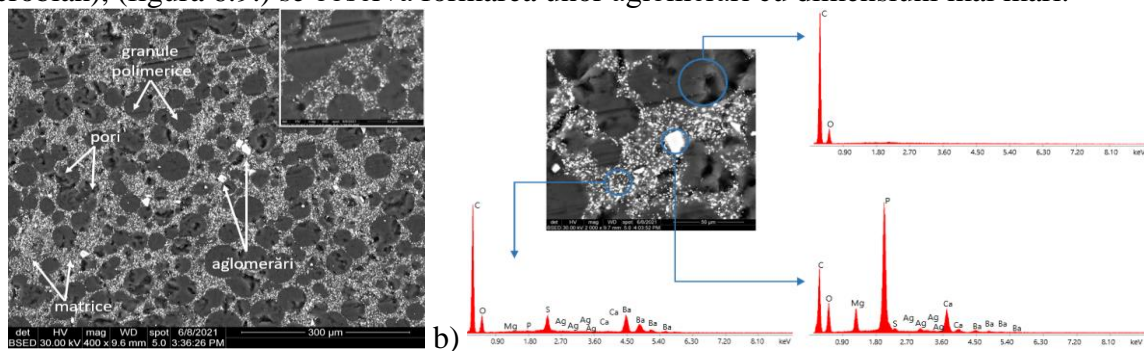


Figura 6.9. Imagine SEM a probei AM2 (400X) a) și Imagine SEM reprezentativă și analiza EDX realizată pe diferite zone pentru proba AM2

Spectrele EDS evidențiază prezența elementelor din compoziția cimentului osos: C, O, Ba, S, Ag, P, Ca și Mg (figura 6.10).

Analiza SEM a relevat că, după întărire, toate cimenturilor osoase analizate au prezentat microstructura tipică cimenturilor pe bază de PMMA, în care sunt evidențiate patru faze: granule din pulberea polimerică; pori; monomerul polymerizat; iar elementul radiopacifiant, în acest caz, sulfatul de bariu ($BaSO_4$) [12,13]. Imaginile SEM arată o bună dispersie a sulfatului de bariu și a aditivilor antimicrobieni în matricea PMMA-PBMA (matricea poli(metacrilat de metil)-poli(metacrilat de butil)). Se poate observa o ușoară tendință a agenților antimicrobieni de a forma aglomerări, mai ales în probele de ciment osos care conțin 4% nanoparticule de argint (proba AM2). Analiza EDS susține această observație și evidențiază prezența elementelor majoritare, C și O, din

cele două faze de polimer, Ba și respectiv S din compoziția elementului de radioopacifiere și Ag, Mg, P, și Ca din HAp și nanoparticule de argint încorporate într-o matrice de sticlă ceramică.

6.1.2. Determinări experimentale de spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier – FTIR

Figura 6.11 reprezintă spectrele FT-IR ale cimenturilor osoase pe bază de PMMA care au fost investigate experimental.

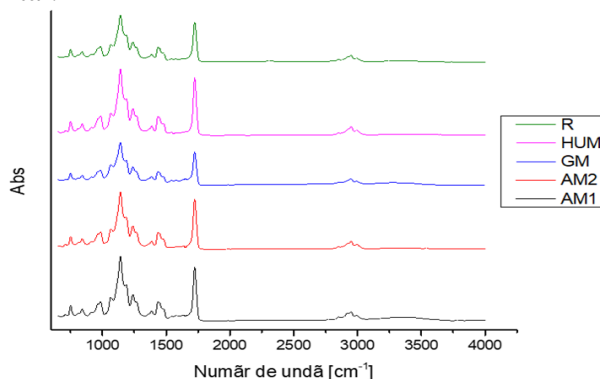


Figura 6.11 Spectrele FT-IR ale cimenturilor osoase

Spectrele FT-IR înregistrate pentru probele experimentale evidențiază benzile caracteristice pentru poli(metacrilat de metil) și Poli(metacrilat de butil), polimeri aflați în compoziția cimenturilor investigate.

La 752 cm^{-1} s-a evidențiat benzile caracteristice ale grupărilor CH din ciclul aromatic prezent în peroxidul de benzoil (BPO) și N-N-dimetil-p-toluidină (componente ale sistemului de inițiere a reacției de polymerizare). Ca urmare a investigațiilor FT-IR, se confirmă faptul că toate cimenturile experimentale sunt din categoria cimenturilor de tip acrilic pe bază de PMMA.

6.1.3. Determinări experimentale de Spectroscopie Raman

Figura 6.12. prezintă spectre Raman colectate pe probele R, GM, HUM, AM1 și AM2. Toate modelele au fost colectate cu o sursă laser roșu (785 cm^{-1}). Corecția de bază polinomială de ordinul doi a fost aplicată ca proces post-achiziție pentru a elimina contribuția de fluorescență.

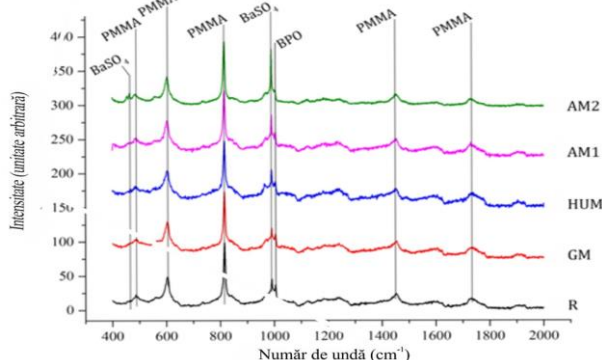


Figura 6.12 Modele Raman colectate pe eșantioane studiate – realizate din PMMA- BaSO_4 -BPO ca și componente majore. Cele mai intense benzi au fost etichetate și atribuite componentei respective a cimentului osos

Spectrele reprezentate au multe asemănări, datorită compoziției similare a diferitelor probe, care sunt preparate cu aceleași componente solide (PMMA, BaSO₄, BPO).

Prin comparație, au fost detectate doar diferențele minore în spectre și constau în diferențe în intensitățile relative ale benzilor specifice.

Cele mai relevante se referă la probele AM1 și AM2 cu semnale relativ mai mari ale benzii de la 990 cm⁻¹ atribuite ν₁(SO₄) din BaSO₄ și probei R cu o intensitate mai mare asociată benzii atribuite vibrației cicluluiromatic (C₆H₆) de la 1000 cm⁻¹ din componenta BPO

6.1.4. Determinări experimentale de difracție de raze X cu dispersie de energie (EDXRD)

În figura de mai jos sunt reprezentate grafic spectrele EDXRD colectate pe probele R, GM, HUM, AM1 și AM2 ca intensitate difractată în funcție de unghiul de împrăștiere 2θ. Cele mai intense reflexii Bragg, sunt cele aparținând componentei PMMA, au fost etichetate cu indici Miller corespunzători. Contribuțiile de fluorescență ale Ba sunt vizibile în dreptul regiunii de 30÷40°.

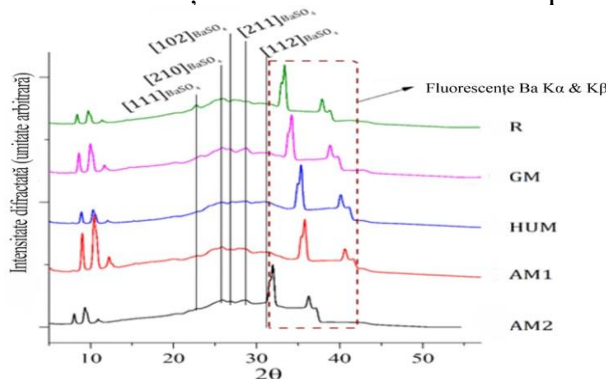


Figura 6.13 Spectrele EDXRD colectate pe probele analizate.

6.2. Evaluarea proprietăților eșantioanelor experimentale de cimenturi osoase

6.2.1. Rezultate experimentale pentru evaluarea proprietăților de umectabilitate prin determinarea unghiului de contact

În figura 6.14 sunt prezentate aspectele picăturilor formate pe suprafețele probelor din cimenturile osoase investigate. Pentru a studia comportamentul hidrofil sau hidrofob al probelor, dar totodată și energia liberă a suprafeței pentru testare s-au utilizat 3 tipuri de lichide și anume: apa, di-iodometanul (DIM) și etilen-glicolul (EG). Comportamentul privind umectabilitatea suprafeței este influențat atât de tipul de probă, cât și de tipul de lichid utilizat, după cum se poate observa și în figura 6.15

Media valorilor unghiurilor de contact măsurate sunt centralizate în Tabelul 6.3.

Tabelul 6.3 Valorile unghiurilor de contact cimenturilor osoase caracterizate

	R	GM	HUM	AM1	AM2
Unghi de contact, Θ [°], apă	70,85	85,10	58,05	55,13	66,86
Unghi de contact, Θ [°], DIM	27,07	40,26	31,17	50,75	40,63
Unghi de contact, Θ [°], EG	57,23	50,05	50,12	52,85	45,94

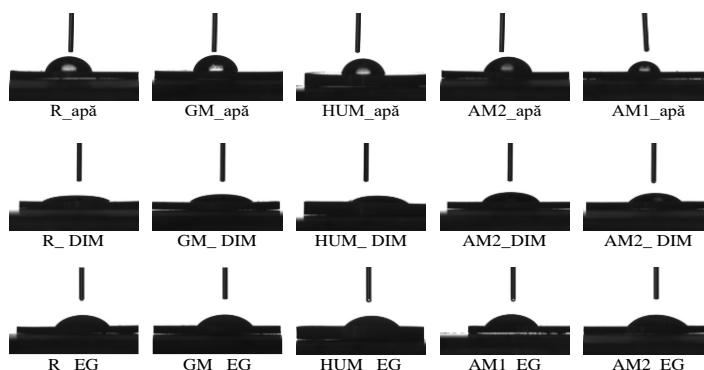


Figura 6.14 Aspectul picăturilor formate pe suprafața

În figura de mai jos este reprezentat printr-un grafic statistic dispersia valorilor unghiurilor de contact înregistrate pentru fiecare probă și fiecare lichid.

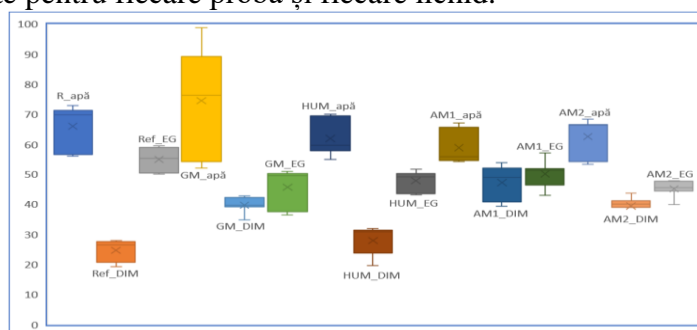


Figura 6.15 Diagrama valorilor unghiurilor de contact testate cu apă, di-iodometan (DIM) și etilen-glicol (EG)

Valorile unghiului de contact pentru probele investigate, atunci când lichidul utilizat pentru testare a fost apă, sunt destul de dispersate, valoarea cea mai mică fiind a probei AM1 ($55,13^\circ$), urmată de proba HUM cu $58,05^\circ$, AM2 $66,86^\circ$, proba referință R $70,85^\circ$, iar cea mai mare valoare o prezintă proba GM $85,10^\circ$.

Valoarea etalon a determinării unghiului de contact a PMMA-ului este de aproximativ 69 de grade. Caracterul cel mai hidrofob poate fi observat în cazul probei GM

Probele HUM, AM1 și AM2 prezintă un caracter mai hidrofil, care este cauzat de componentele ceramice (hidroxiapatită și sticlă ceramică) care au fost adăugate cu agenții antimicrobiene respectivi.

6.2.2. Rezultate experimentale privind determinarea gradului de hidratare

Gradul de hidratare (capacitatea de absorbție a apei) este o proprietate importantă a materialelor care influențează comportamentul cimentului osos

Mai mult, apa poate pătrunde mai ușor într-o structură poroasă, eterogenă, la zona de interfață dintre polimer și materialul de umplură. Zonele mai eterogene din structura materialului reprezintă numeroase spații prin care se poate acumula apa.

În figura este reprezentată grafic evoluția gradului de hidratare (H_a) evaluată în apă distilată la o temperatură de 37°C pe o perioadă de 21 zile, pentru toate probele experimentale obținute din

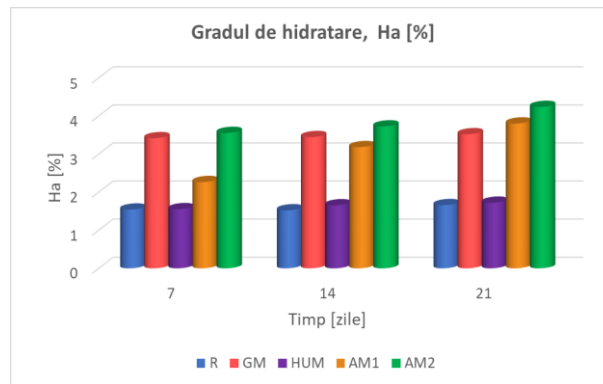


Figura 6.16 Variația gradului de hidratare pe o perioadă de 21 de zile în apă distilată, la 37 °C, pentru probele experimentale

6.2.3. Rezultate experimentale pentru determinarea ratei de degradare

În figura este reprezentată variația ratei de degradare pe o perioadă de 28 de zile în fluid fiziologic simulat (SBF) la o temp. de 37°C, pentru cimenturile osoase investigate. Se observă o creștere a ratei de degradare pentru probele ce conțin gentamicină și ulei esențial de mentă, în timp ce proba de referință are o rată de degradare constantă în timp. În cazul probelor ce conțin nanoparticule de argint, până la 28 de zile nu se observă un proces de degradare, ci doar un proces continuu de absorbție.

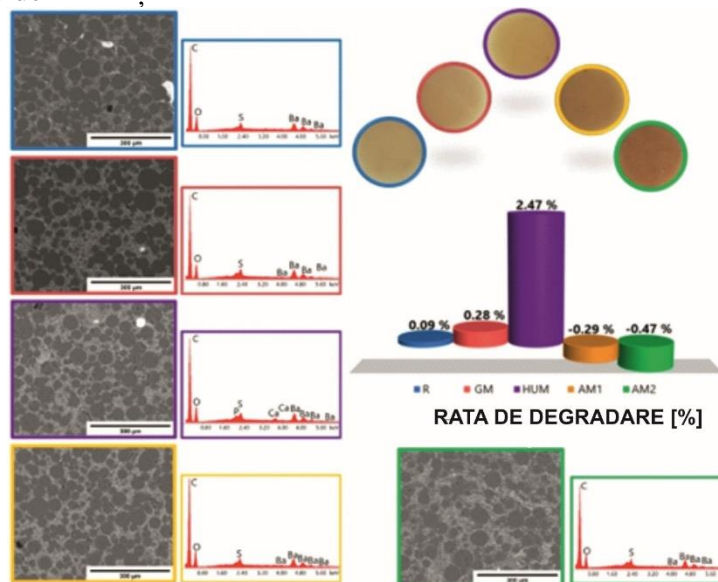


Figura 6.18 Aspecte morfologice relevate prin SEM și analiza elementală a suprafeței prin EDS a cimenturilor osoase experimentale PMMA după 28 de zile în SBF

Rezultatele înregistrate pentru gradul de hidratare și rata de degradare sunt în concordanță cu rezultatele obținute la evaluarea umectabilității suprafețelor prin determinarea unghiului de contact.

6.2.4. Studiu experimental privind determinarea proprietăților mecanice

Determinarea experimentală a rezistenței la încovoiere

Un ciment osos cu o rezistență ridicată la încovoiere permite o grosime foarte subțire a mantalei de ciment osos și, prin urmare, este ideal pentru opțiuni de tratament minim invazive, dar și pentru protezele de șold sau de genunchi.

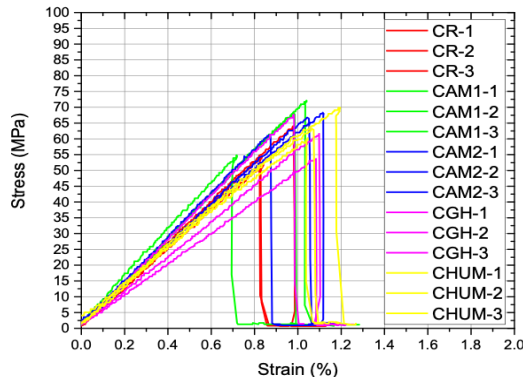


Figura 6.25 Diagrama comparativă a încercărilor la încovoiere

Valorile medii ale rezistenței la încovoiere arată că adăugarea de agenți antimicrobieni produce o creștere: cu 3,7% pentru probele GH; 9,5% pentru probele HUM; 10,5% și 11,4% pentru probele AM1 și AM2. Aparent, rezultatele de rezistență la încovoiere obținute nu sunt puternic influențate de adăugarea de aditivi antimicrobieni, toate valorile înregistrate fiind peste limita cerută de Standardul Internațional ISO 5833, cel puțin 50MPa.

Determinarea experimentală a rezistenței la compresiune

Indiferent de agentul antimicrobian adăugat, comportamentul mecanic a fost în mare parte similar în regiunea elastică. Aparent, în raport cu proba de referință (R) adăugarea gentamicinei (proba GH) nu influențează modulul de elasticitate al cimentului osos, în timp ce adăugarea de nanoparticule de argint (probele AM1 și AM2) duce la o scădere ușoară, cu aproximativ 4% și 5% din valorile acestuia. Adăugarea de ulei de mentă în hidroxiapatită prezintă o scădere mai puternică, cu aproximativ 9%.

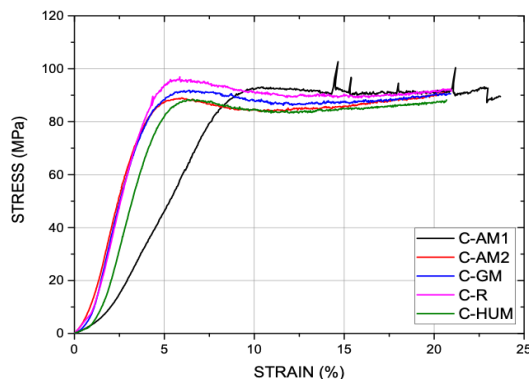


Figura 6.26 Diagrama cu rezultatele testării de compresiune pentru toate probele experimentale

În ciuda faptului că în testul de compresiune adăugarea de agenți antimicrobieni duce la o scădere a caracteristicilor mecanice, această scădere este de o amplitudine acceptabilă (maximum 12%), iar valorile de rezistență pentru cimentul osos investigat respectă totuși cerințele minime stipulate de standardul ASTM F451 (adică o rezistență de cel puțin 70 MPa).

Determinarea experimentală a durității Shore D

O caracteristică esențială a cimenturilor osoase o reprezintă duritatea. În eșantioanele testate, acest parametru se modifică în funcție de aditivi astfel: pornind de la R (medie a durității Shore D de 85,5 °ShD) – care are și cea mai mare valoare determinată urmată de proba de ciment osos cu gentamicină, al cărui adaos scade cu o unitate media durităților shore D determinate (84,5°ShD).

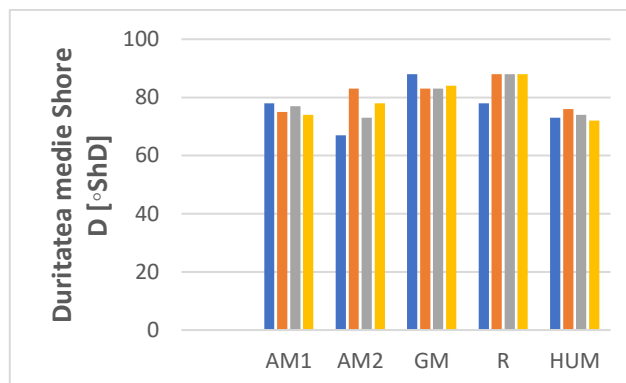


Figura 6.27 Graficul durităților Shore D determinate pe cimenturile osoase experimentale

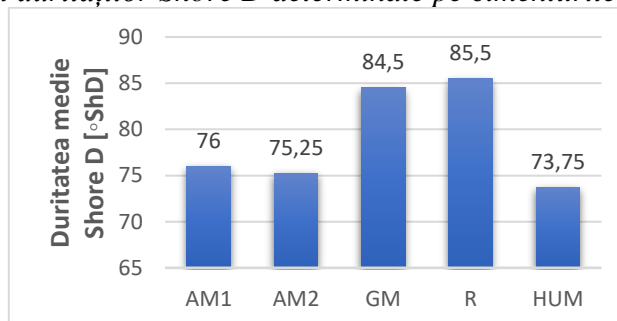


Figura 6.28 Media durităților Shore D determinate pe cele cinci cimenturi osoase experimentale

La o diferență considerabilă (76 °ShD) regăsim media valorilor probei cu conținut de 2% particule de argint urmată imediat de cea cu conținut de 4% Ag (75,25 °ShD). Influența cea mai mare asupra durității noilor cimenturi osoase o reprezintă adaosul de 10% ulei de mentă (73,75°ShD), care scade cu 11,75 unități duritatea, raportat la proba de referință (85,5 °ShD).

Concluzia este că fiecare dintre aditivi a influențat duritatea cimenturilor osoase, dar toate se încadrează în standardele de duritate existente.

6.3. Evaluarea activității antimicrobiene și a biocompatibilității eșantioanelor experimentale de cimenturi osoase

6.3.1. Rezultate experimentale de determinare calitativă a activității antimicrobiene prin metoda difuzimetrică

Testele experimentale au arătat că eșantionul de ciment osos încărcat cu gentamicină (GM) a exprimat o zonă de inhibiție clară doar față de tulpinile bacteriene, fiind folosit ca martor pozitiv pentru mostrele de ciment osos încărcate cu alți agenți antimicrobieni diferiți. În același timp, proba HUM și proba AM2 și-au arătat efectul inhibitor, generând zone de inhibiție clare cu diametre

comparative cu cele ale probei GM: 25 mm pentru *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 și 20 mm pentru *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (Figura 1).

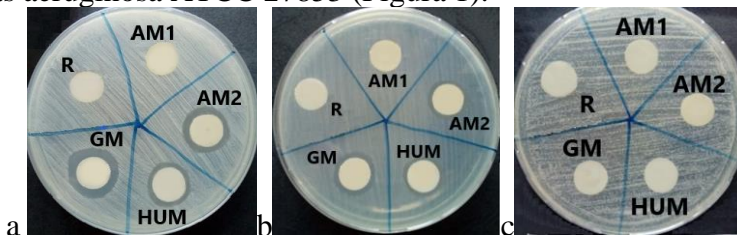


Figura 6.29 Evaluarea proprietăților antimicrobiene pentru cimenturile osoase PMMA experimentale: (a) zona de inhibare a creșterii pentru tulpina Gram-positivă *Staphylococcus aureus* ATCC 2592; (b) pentru tulpina Gram-negativă *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, c) pentru tulpina *Candida albicans* ATCC 10231, după 72 de ore de incubație

Cea mai scăzută sensibilitate a fost exprimată de tulpinile fungice de *Candida albicans* ATCC 10231. În acest caz, toate probele testate nu au prezentat nicio zonă de inhibiție (Figura 6.29).

6.3.2. Rezultate experimentale de determinare a capacității de aderență a tulpinilor microbiene la suprafața probelor de ciment osos

Evaluarea cantitativă a capacității tulpinilor selectate de a adera și de a genera biofilm pe suprafața probelor testate a fost efectuată folosind metoda de numărare a celulelor viabile. Valorile CFU/mL au fost determinate pentru biofilmele dezvoltate la 24, 48 și 72 de ore, pe substratul inert reprezentat de probele de ciment osos.

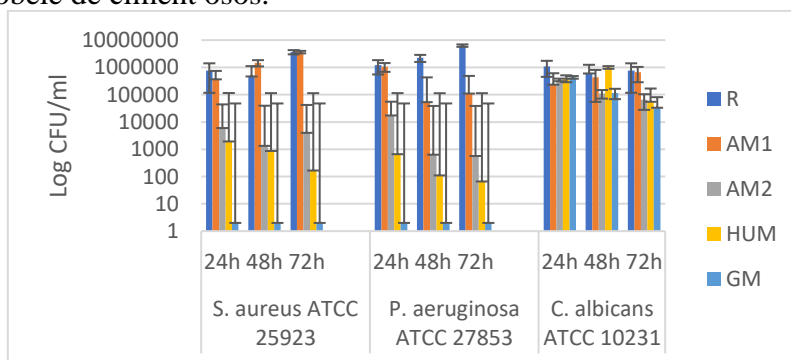


Figura 6.30 Reprezentarea grafică a valorilor CFU/ml care evaluează gradul de dezvoltare a biofilmului microbial pe suprafața probelor de ciment osos testate

Pentru cimenturile osoase investigate de noi rezultatele arată că, deși celulele bacteriene au aderat slab la suprafața cimentului osos după 24 ore de incubație, nu au putut dezvolta un biofilm matur, iar scăderea valorilor CFU/mL după 48 nu a fost semnificativă.

În schimb, capacitatea tulpinii *Candida albicans* de a adera și genera biofilm NU a fost semnificativ, înregistrându-se cele mai mari valori ale CFU/mL.

6.3.3. Rezultate experimentale de determinare a biocompatibilității cimenturilor osoase

Rezultatele testului MTT evidențiază faptul că probele de ciment osos testate au stimulat metabolismul celular, cu o creștere semnificativă a proliferării comparativ cu proba martor (CTRL).

Testul MTT a arătat că toate cimenturile osoase testate nu au avut efect citotoxic, valorile viabilităților fiind mai mari în comparație cu proba martor. Imaginile de fluorescență au arătat că celulele MG-63 au fost viabile și nu au fost observate celule moarte sau fragmente de celule. Mai

mult, celulele au format filamente pentru a se deplasa și a stabili contacte cu celulele vecine, sugerând că celulele MG-63 au prezentat un fenotip activ.

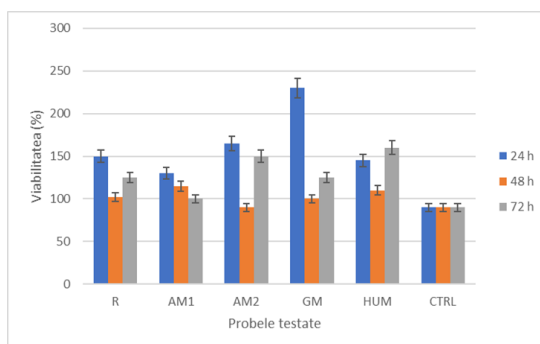


Figura 6.31 Testul MTT care arată viabilitatea celulelor MG-63 în prezența cimenturilor osoase PMMA experimentale după 24, 48 și 72 de ore.

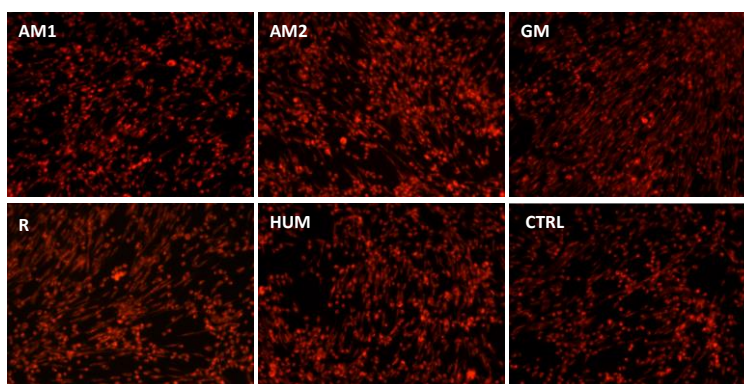


Figura 6.32. Imagini de fluorescență ale celulelor MG-63 colorate cu fluorofor CMTPX în prezența cimenturilor osoase experimentale.

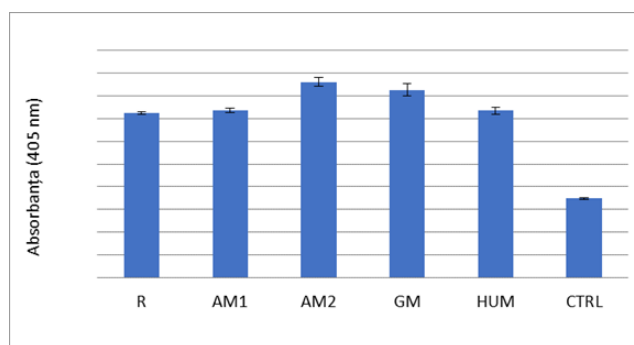


Figura 6.33. Testul Alizarin Red care arată potențialul osteogenic al cimenturilor osoase experimentale pe celulele MG-63

Potențialul osteogen al cimenturilor osoase pe celulele MG-63 a fost cuantificat utilizând testul Alizarin Red. După 21 de zile, în prezența cimenturilor osoase, celulele MG-63 și-au crescut potențialul osteogen. Acest lucru a fost demonstrat de o creștere a depozitelor de calciu în toate probele comparativ cu proba de control (CTRL).

6.3.4. Concluzii privind evaluarea antimicrobiană și a biocompatibilității eșantioanelor experimentale de cimenturi osoase

Proprietățile antimicrobiene au fost demonstrate pentru probele GM, HUM și AM2, care au generat zone clare de inhibiție față de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 și *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. S-a observat că nu doar tipul de agent antimicrobian este important, ci și cantitatea utilizată.

Staphylococcus aureus și *Pseudomonas aeruginosa* sunt cunoscuți a fi agenți patogeni relevanți clinic asociați cu infecția osoasă și, respectiv, rezistența intrinsecă la medicamente. În ceea ce privește biocompatibilitatea evaluată prin testul MTT folosind celule MG-63 umane, toate cimenturile sunt biocompatibile fără niciun efect de citotoxicitate.

Performanța cimenturilor osoase cu ulei esențial de mentă și nanoparticule de argint împotriva acestor doi agenți patogeni sugerează că acești aditivi antimicrobiene par promițători a fi utilizați în practica clinică împotriva infecțiilor bacteriene.

Cap.7. Concluzii, contribuții proprii și direcții viitoare

7.1. Concluzii și contribuții proprii

Lucrarea cu titlul “**Contribuții privind dezvoltarea unor noi materiale din categoria cimenturilor acrilice antimicrobiene utilizate pentru fixarea endoprotezelor de șold**” se constituie într-o analiză a studiilor și preocupărilor actuale ale cercetării științifice privind obținerea unor noi cimenturi osoase utilizate pentru fixarea protezelor.

Prima concluzie care s-a desprins în urma analizelor teoretice și experimentale realizate, se poate spune că a început să fie completat golul de informație de la linia de demarcație dintre cercetările din domeniul medical și cel al ingineriei.

Rezultatele obținute și interpretarea lor au permis concluzionarea contribuțiilor tezei de doctorat, o serie dintre acestea constituindu-se în contribuții originale. Cercetările teoretice și experimentele au fost direcționate astfel încât să aducă contribuții majore atât în plan fundamental cât și în plan practic și anume:

1. Contribuții privind oportunitatea abordării temei în conținutul cercetărilor întreprinse pe plan mondial și național privind cimenturile acrilice antimicrobiene utilizate pentru fixarea endoprotezelor de șold.
2. Contribuții privind stabilirea programului experimental și metodologia de cercetare în concordanță cu metodele standardizate, aliniate la nivelul cerințelor Uniunii Europene și metodele neconvenționale.
3. Contribuției privind procesele care au loc la interfața ciment – implant - țesut.
4. Contribuții privind stabilirea posibilităților teoretice și aplicative de realizare și modificare a caracteristicilor biomaterialelor polimerice.
5. Contribuții privind realizare unor cimenturile de tip acrilic antimicrobiene.
6. Partea de sinteză teoretică cuprinde unele contribuții originale ale autorului tezei de doctorat constând în integrarea problematicii studiate în cadrul mai larg al cunoașterii în domeniul ingineriei medicale.

Concluzii și aprecieri cu caracter general

Din analiza prezentei teze de doctorat, rezultă următoarele concluzii și aprecieri cu caracter general:

1. Artroplastia totală de șold (THA) restabilește funcționalitatea și mobilitatea pacienților care suferă de o boală articulară degenerativă a șoldului. Endoproteza totală de șold are ca scop

preluarea funcției biomecanice a articulației atunci când aceasta este grav afectată. Fixarea componentei femurale și a componentei acetabulare la o endoproteză de șold poate fi realizată prin utilizarea cimentului osos (proteză cimentată) sau prin presare pe os (proteză necimentată).

2. Deși în 1870 Themistokles Gluck, a fixat o proteză totală de genunchi din fildeș folosind ciment din ipsos și colofonie, prima utilizare a cimentului osos în ortopedie este atribuită pe scară largă celebrului chirurg englez, John Charnley, care, în 1958 l-a folosit pentru artroplastia totală de șold a unei proteze femurale metalice. Acesta a fost o piatră de hotar importantă în progresul procedurilor chirurgicale ortopedice. De asemenea, Charnley a fost primul care a realizat că PMMA-ul poate fi utilizat cu ușurință pentru a umple canalul medular și este ușor de modelat pe morfologia osului.

3. Cimentul osos ajută la umplerea micilor defecte osoase sau la fixarea componentelor osoase pe proteze ortopedice sau dentare. Cimentul PMMA este unul dintre cele mai rezistente materiale folosite în ortopedie, având un rol extrem de important în activitatea endoprotetică, precum și în alte intervenții reconstructive. PMMA, împreună cu diverși aditivi, conferă amestecului un set de proprietăți fizice și chimice. În prezent, cimenturile osoase cele mai frecvent utilizate pot fi clasificate în două categorii: cimenturile osoase de tip acrilic și cimenturile osoase de tip fosfat de calciu.

4. Cimentul osos de tip acrilic este în prezent cel mai utilizat biomaterial pentru fixarea endoprotezelor utilizate în artroplastie și are o performanță ridicată datorită gamei sale de proprietăți. Cimenturile osoase pe bază de PMMA sunt sisteme bicomponente, care cuprind o fază solidă (o pulbere de polimer) și o fază lichidă (un monomer lichid).

5. Atunci când un biomaterial sintetic este implantat în organism fără nicio funcție imunitară, există întotdeauna riscul unei infecții, iar cimenturile osoase nu sunt exceptate. O endoproteză implantată este deosebit de sensibilă la dezvoltarea bacteriilor pe suprafața sa, deoarece microorganismele se pot multiplica ca o reacție adversă a sistemului imunitar al organismului asupra unui corp străin, prin contaminare primară din cauza materialelor nesterile sau prin răspândirea hematogenă, unde infecția provine dintr-un loc îndepărtat și este transferată în zona implantului. Pe măsură ce bacteriile se reproduc, acestea formează un biofilm protector, care are o sensibilitate scăzută la antibiotice.

6. Utilizarea cimenturilor osoase cu antibiotice reduce incidența infecției mai ales dacă este utilizată în asociere cu administrarea orală de antibiotice. În schimb, eficacitatea clinică a cimenturilor osoase care eliberează antibiotice nu este universal acceptată datorită faptului că expunerea pe termen lung la doze mici, poate fi o cauză pentru dezvoltarea rezistenței la antibiotice. Mulți factori bacteriologici, fizici și chimici ar trebui luați în considerare la selectarea unui antibiotic, precum spectrul antibacterian, efectul bactericid bun la concentrații scăzute, alergenicitate scăzută, efectul nesemnificativ asupra performanței cimentului, stabilitate chimică și termică, solubilitatea în apă datorită dimensiunilor moleculare mici și rata bună de eliberare a antibioticelor din cimentul osos.

7. Utilizarea pe scară largă a antibioticelor a condus la dezvoltarea unor mecanisme genetice și biochimice care permit bacteriilor să supraviețuiască în medii cu antibiotice. Acest lucru este un motiv de îngrijorare în ceea ce privește eficacitatea antibioticelor folosite în mod obișnuit în compoziția cimenturilor osoase, în special eficacitatea gentamicinei. Astfel, problema eficienței reduse a antibioticelor în componența cimenturilor osoase a creat necesitatea de a investiga noi agenți antimicrobieni care să fie introduși în cimentul osos. Nanoparticulele de argint conferă proprietăți chimice și fizice unice care îmbunătățesc mult efectele antimicrobiene ale argintului. Ionii de argint inactivează enzimele vitale pentru bacterii și dezactivează mecanismul de replicare a ADN-ului bacterian. Aplicarea clinică este limitată de dificultatea de a încorpora și dispersa nanoparticulele de argint în cimenturile osoase acrilice. Cu toate acestea, studiile sunt contradictorii

în ceea ce privește influența adaosului de nanoparticule de argint în cimenturile osoase de tip acrilic. Este totuși cert, faptul că, odată cu creșterea concentrației de nanoparticule de argint scade rezistența mecanică a cimenturilor osoase. În vederea stabilirii concentrațiilor optime pentru a corespunde unei activități antimicrobiene adecvate pe termen lung, dar totodată și pentru a se menține proprietățile mecanice necesare îndeplinirii funcției clinice, sunt necesare studii suplimentare.

8. Există câțiva factori legați de tehnica de amestecare, prezența sângelui, a grăsimilor sau a fluidelor corporale sau a posibilelor delaminări produse la introducerea cimentului în cavitatea osoasă, care vor afecta volumul și microstructura inter-facială a cimenturilor și, în consecință, comportamentul lor mecanic. Prezența porozității în cimenturile osoase depinde puternic de tehnica de amestecare utilizată. Tehnicile utilizate pentru reducerea porozității includ amestecarea mecanică sau cu ultrasunete, presurizarea cimentului, centrifugarea amestecului și amestecarea în vid.

9. Principalii aditivi găsiți de obicei în cimenturile osoase sunt elemente radioopacizant, cum ar fi $BaSO_4$ și ZrO_2 și antibioticele. S-a demonstrat că acești agenți radioopacizanți au un efect semnificativ asupra proprietăților mecanice ale cimenturilor osoase de tip acrilic, care influențează de asemenea morfologia cimentului. Adăugarea de antibiotice reduce proprietățile lor mecanice, deși această influență depinde foarte puternic de cantitatea de antibiotic adăugată. Au fost investigați și alți aditivi cu scopul de a îmbunătăți proprietățile mecanice ale cimenturilor analizate, prin consolidarea matricei de ciment cu particule dure, cum ar fi particule din sticlă ceramică, fie cu fibre sau nanotuburi de carbon, fie prin adăugare de os anorganic sau matricea osoasă demineralizată (hidroxiapatită sau alți fosfați de calciu), care ar putea îmbunătăți atât proprietățile mecanice ale cimentului, cât și interacțiunea os-ciment, creând o legătură directă între aceste particule bioactive și osul înconjurător.

7.2. Contribuții proprii și posibilități de valorificare ale cercetărilor

Cercetarile experimentale efectuate au adus o serie de contribuții originale obținute și prin interpretarea lor teoretică. Contribuțiile originale și cele mai importante rezultate obținute vor fi prezentate:

1. S-a efectuat o sinteză complexă a documentației științifice, care a condus la obținerea multor rezultate și interpretări noi, multe fiind inovatoare și originale.
2. S-au realizat pentru prima oară la noi în țară corelații între condițiile intra-operatorii, tipul de endoproteză de șold, caracteristicile cimentului osos utilizat și manipularea lui pentru fixarea protezelor.
3. În vederea obținerii unor cimenturi de tip acrilic cu aditivi antimicrobieni utilizabile pentru fixarea componentelor femurale ale endoprotezelor totale de șold s-au stabilit fluxul de elaborare.
4. S-a realizat un studiu de caz și cercetări experimentale aferente de selectare a unui ulei esențial cu proprietăți antimicrobiene optime, utilizabil la dezvoltarea unor noi cimenturi osoase antimicrobiene
5. A fost conceput fluxul de obținere a cimentului osos, verificate prin cercetările experimentale proprii.
6. Rezultatele obținute în urma cercetărilor experimentale efectuate, coroborate cu studiile efectuate pe baza informațiilor din literatură, au permis formularea unor aspecte originale privind conceptele de biocompatibilitate și biofuncționalitate.
7. Plecând de la datele statistice furnizate de principalii producători de cimenturi pentru proteze de șold și a prelucrării informatizate a acestora, s-a realizat o bază de date cu caracter original ce s-a utilizat la elaborarea modelului selecției a acestuia în funcție de aplicabilitate.

8. A fost realizată o analiză statistică a rezultatelor clinice privind utilizarea protezelor de tip BHR, într-o clinică de ortopedie, pentru a identifica cauzele de eșec a acestora.
9. A fost realizată analiza comparativă in vitro a cimenturilor comerciale utilizate în studiul anterior (Aminofix 1, Aminofix 3, Simplex P) urmând cronologia intervenției chirurgicale, pentru evaluarea factorilor care au influențat compoziția chimică și structura fiecărei probe de ciment osos în condiții intraoperatorii specifice.
10. A fost realizată caracterizarea fizico-chimică a trei uleiuri esențiale și efectului antimicrobian a trei uleiuri esențiale cu scopul clar definit de a demonstra eventualele proprietăți antibacteriene, ce le-ar putea dovedi a fi utilizabile la dezvoltarea unor noi cimenturilor osoase antibacteriene.
11. A fost realizată caracterizarea cu scopul clar definit de a demonstra eventualele proprietăți antibacteriene, care le-ar putea dovedi a fi utilizabile la dezvoltarea unor noi cimenturilor osoase antibacteriene.
12. Au fost obținute noi cimenturi osoase cu proprietăți antimicrobiene, prin modificarea componentei anorganice a unui ciment comercial pe bază de PMMA, cu vâscozitate standard, utilizând ca agenți antimicrobieni, nanoparticule de argint înglobate într-o sticlă ceramică (2% și 4%), respectiv hidroxiapatită impregnată cu ulei de mentă și gentamicină, fiind obținute 3 compoziții de noi cimenturi osoase:
- ciment osos cu hidroxiapatită impregnată cu 10% ulei esențial de mentă și a rezultat proba experimentală HUM,
 - ciment osos cu 2% nanoparticule de argint înglobate într-o sticlă ceramică și a rezultat proba experimentală AM1
 - ciment osos cu 4% nanoparticule de argint înglobate într-o sticlă ceramică și a rezultat proba experimentală AM2
13. A fost realizată caracterizarea morfologică și structurală și evaluarea proprietăților cimenturilor osoase noi cu proprietăți antimicrobiene
14. A fost realizată caracterizarea evaluarea activităților antimicrobiene și de biocompatibilitate a eșantioanelor experimentale de cimenturi osoase noi obținute
15. Probele experimentale au fost analizate prin SEM cuplată cu EDS și spectroscopie FT-IR, pentru caracterizarea morfologică și structurală a cimenturilor osoase studiate. De asemenea, au fost evaluate proprietățile de umectabilitate a suprafeței prin determinarea unghiului de contact și s-a realizat studiul degradării probelor în mediu fiziologic simulat (SBF). Analiza SEM a relevat că, după întărire, toate cimenturilor osoase analizate au prezentat microstructura tipică cimenturilor pe bază de PMMA și se observă o bună dispersie a sulfatului de bariu și a aditivilor antimicrobieni în matricea PMMA-PBMA, iar analiza EDS susține această observație și evidențiază prezența elementelor majoritare, C și O, din cele două faze de polimer, Ba și respectiv S din compoziția elementului de radioopacifiere și Ag, Mg, P, și Ca din HAp și nanoparticule de argint încorporate într-o matrice de sticlă ceramică.
16. Determinări experimentale de Spectroscopie Raman și Determinări experimentale de difracție de raze X cu dispersie de energie (EDXRD) au confirmat faptul că noile cimenturi osoase nu au modificari semnificative la nivel structural.
17. Evaluarea proprietăților eșantioanelor experimentale de cimenturi osoase au demonstrat faptul că adăugarea de agenți antimicrobieni nu a indus modificări structurale în noile eșantioane de ciment osos PMMA dezvoltate. Toate specișenele experimentale au avut o structură și morfologie tipică pentru cimenturile osoase PMMA, cu o ușoară tendință de a forma aglomerate, mai ales în probele de cimenturi osoase PMMA conținând 4% nanoparticule de argint.
18. Umiditatea măsurată prin unghiul de contact a scăzut prin adăugarea agenților antimicrobieni, cu excepția cazului cimenturilor osoase PMMA modificate cu gentamicină. Toți aditivii utilizați au păstrat valorile unghiului de contact în limitele dorite și au arătat o bună aderență celulară.

19. Expunerea probelor experimentale de ciment osos PMMA la apă și soluție de SBF nu a afectat semnificativ structura acestora. Adăugarea de agenți antimicrobieni nu a afectat semnificativ gradul de hidratare și degradare al cimenturilor osoase PMMA.

20. Proprietățile antimicrobiene au fost demonstrate pentru probele GM, HUM și AM2, care au generat zone clare de inhibiție față de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 și *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. S-a observat că nu doar tipul de agent antimicrobian este important, ci și cantitatea utilizată.

21. *Staphylococcus aureus* și *Pseudomonas aeruginosa* sunt cunoscuți a fi agenți patogeni relevanți clinic asociați cu infecția osoasă și, respectiv, rezistența intrinsecă la medicamente.

22. În ceea ce privește biocompatibilitatea evaluată prin testul MTT folosind celule MG-63 umane, toate cimenturile sunt biocompatibile fără niciun efect de citotoxicitate.

23. Performanța cimenturilor osoase cu ulei esențial de mentă și nanoparticule de argint împotriva acestor doi agenți patogeni sugerează că acești aditivi antimicrobiene sunt promițători pentru a fi utilizați în practica clinică pentru fixarea protezelor de sold, protejând împotriva infecțiilor bacteriene.

Se menționează faptul că partea experimentală a fost efectuată în principal în cadrul Facultății Știința și Ingineria Materialelor, Catedra Știința Materialelor și Metalurgie Fizică, dar au fost efectuate determinări experimentale și în alte laboratoare. Dintre acestea se remarcă cercetările experimentale efectuate în cadrul laboratoarelor Universității din București, Facultatea de Biologie, Departamentul de microbiologie.

Fără a pretinde că epuizează cercetările teoretice și experimentale în domeniul analizat, lucrarea își aduce o modestă contribuție teoretică și practică, deschizând în același timp noi perspective pentru cercetările viitoare.

7.3. Direcții viitoare de cercetare

Cercetările viitoare vor urmări realizarea unor studii de determinare a rezistențelor mecanice pentru cimenturile osoase investigate; studierea produșilor chimici eliberați în urma degradării materialelor investigate, în vederea stabilirii efectului pe care îl poate avea asupra organismului uman și studierea proprietăților biologice prin efectuarea testelor de biocompatibilitate *in vitro* și *in vivo* pe model animal.

De asemenea, cercetările viitoare se vor axa pe obținerea unor noi cimenturi osoase cu proprietăți antimicrobiene prin adăugarea altor aditivi sau prin modificarea cantităților pentru îmbunătățirea proprietăților:

- ciment osos cu hidroxiapatită impregnată cu ulei esențial de oregano (acesta fiind recunoscut pe scară largă pentru activitatea lor antimicrobiană, dar și pentru proprietățile sale antivirale și antifungice, dar și pentru proprietățile sale antioxidante, antiinflamatorii, antidiabetice)[14–23].
- ciment osos cu hidroxiapatită impregnată cu 5, 15, 20 sau 25% ulei esențial de mentă
- ciment osos cu modificarea cantității de nanoparticule de argint înglobate într-o sticlă ceramică în cantități diferite de cele prezentate în prezenta teza de doctorat, respectiv cu 1% și cu 2% Ag

7.4. Diseminarea rezultatelor obținute

Articole:

1. Articol prim autor - *Additives Imparting Antimicrobial Properties to Acrylic Bone Cements* / revista **MATERIALS (Q1)** - <https://www.mdpi.com/1996-1944/14/22/7031#cite>

Robu, A.; Antoniac, A.; Grosu, E.; Vasile, E.; Raiciu, A.D.; Iordache, F.; Antoniac, V.I.; Rau, J.V.; Yankova, V.G.; Ditu, L.M.; Saceleanu, V. Additives Imparting Antimicrobial Properties to Acrylic Bone Cements. *Materials* **2021**, *14*, 7031. <https://doi.org/10.3390/ma14227031>

2. Articol prim autor – *Bone Cements Used for Hip Prosthesis Fixation: The Influence of the Handling Procedures on Functional Properties Observed during In Vitro Study* / revista **Materials (Q1)** - <https://www.mdpi.com/1996-1944/15/9/2967#cite>

Robu, A.; Ciocoiu, R.; Antoniac, A.; Antoniac, I.; Raiciu, A.D.; Dura, H.; Fornă, N.; Cristea, M.B.; Carstoc, I.D. Bone Cements Used for Hip Prosthesis Fixation: The Influence of the Handling Procedures on Functional Properties Observed during *In Vitro* Study. *Materials* **2022**, *15*, 2967. <https://doi.org/10.3390/ma15092967>

3. Articol - *Failure analyses of a non-cemented hip prostheses failed due to the stem fracture* / revista **University Politehnica of Bucharest Scientific Bulletin series B – Chemistry and materials science**

Milea, G.C.; Neculescu, D.A.; Ghiban, B; Stere, A; **Robu, A**; Bujor, C; Ene, R; Fornă, Failure analyses of a non-cemented hip prostheses failed due to the stem fracture, revista *UPB Scientific Bulletin series B – Chemistry and materials science*, **2022**, *84*, *2*, 175-186. https://www.scientificbulletin.upb.ro/rev_docs_arhiva/rez8c4_562063.pdf

4. Review - *Magnesium-Based Alloys Used in Orthopedic Surgery* / revista **MATERIALS (Q1)** - [https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35161092/#:~:text=Magnesium%20\(Mg\)%20based%20alloys,nondegradable%20metals%20implants%20in%20orthopedics](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35161092/#:~:text=Magnesium%20(Mg)%20based%20alloys,nondegradable%20metals%20implants%20in%20orthopedics)

Antoniac, I; Miculescu, M; Manescu, V; Stere, A; Quan, PH; Paltanea, G; **Robu, A**; Earar, K. Magnesium-Based Alloys Used in Orthopedic Surgery, *Materials*, **2022**, *15*, 1148, <https://doi.org/10.3390/ma15031148>

5. Articol - *Fluoride Treatment and In Vitro Corrosion Behavior of Mg-Nd-Y-Zn-Zr Alloys Type* / revista **MATERIALS (Q1)** – <https://www.mdpi.com/1996-1944/15/2/566>

Quan, PH; Antoniac, I; Miculescu, F; Antoniac, A; Manescu, V; **Robu, A**; Bită, AI; Miculescu, M; Saceleanu, A; Bodog, AD; Saceleanu, V, Fluoride Treatment and In Vitro Corrosion Behavior of Mg-Nd-Y-Zn-Zr Alloys Type, *Materials*, **2022**, *15*, *2*, 566, [10.3390/ma15020566](https://doi.org/10.3390/ma15020566)

Participări la conferințe internaționale:

1. Aurora ANTONIAC*, Iulian ANTONIAC, Elena GROSU, Iuliana Mihaela DELEANU, **Alina ROBU***, Anca Daniela RAICIU, *Swelling properties and water vapor permeability of some compositions based on biopolymers and essential oils*, International Conference on Innovative Research, ICIR EUROINVENT, IASI, May, 26-27, 2022

2. Lavinia DRAGOMIR, **Alina ROBU**, Aurora ANTONIAC*, Iulian ANTONIAC, Alina VLADESCU, Horatiu DURA, Norin FORNA, Mihai Bogdan CRISTEA and Ioana CARSTOC, *Biodegradation Evaluation of some Magnesium-based Alloys type Mg-Zn-Zr-Ag before and after*

Capitole de carte:

1. Capitol de carte: Editura Printech, Bucuresti, ISBN 978-606-23-1306-7, Materiale utilizate în medicină – aspecte interdisciplinare, editor Antoniac Iulian; Capitol: cimenturi osoase utilizate în ortopedie, Autor: Alina Robu, paginile 83-123
2. Capitol de carte: Editura Printech, Bucuresti, ISBN 978-606-23-1306-7, Materiale utilizate în medicină – aspecte interdisciplinare, editor Antoniac Iulian; Capitol Perspective in sistemele terapeutice transdermice Autori: Grosu Elena, Antoniac Aurora, Antoniac Iulian, Raiciu Anca Daniela, Robu Alina, paginile 1-39

Rezumatul de față cuprinde într-o formă concisă conținutul capitolelor 1-7. Numerotarea capitolelor, subcapitolelor, a figurilor și a tabelor corespunde cu cea din teză. Sunt prezentate referințele bibliografice semnificative folosite în rezumatul tezei.

Lista figurilor

Figura 1.1. Osul femural

Figura 1.2 Evoluția endoprotezelor de șold

Figura 1.3 Reprezentarea grafică a unei endoproteze totale de șold cimentată

Figura 1.4. Componente femurale de tip monobloc

Figura 1.5 Cupe acetabulare confecționate din polietilenă

Figura 1.6 Exemple de capete femurale utilizate în practică. a – oțel inoxidabil, b – Oxinium, c – CoCrMo, d - Zirconia, e - ZTA (BioloX Delta)

Figura 1.7 Componente femurale a) TaperLoc Zimmer-Biomet CoCr, b) Origin DJO Orthopedics Sydney Australia acoperit cu hidroxiapatită, c) Bencox ID stem (Corentec, Korea). d) Taperloc stem (Biomet, USA)

Figura 1.8. a) Implant cimentat care stabilizează o proteza metalică direct pe osul femural.

b) implant necimentat, presat în osul femural, cu o suprafață poroasă pentru a favoriza interacțiunea os-implant

Figura 1.9 Constituenții, produșii finali și mecanismul de stabilizare a cimenturilor osoase cu fosfat de calciu

Figura 1.10 Compoziția chimică și proprietățile metacrilatului de metil și a poli(metacrilatului de metil)

Figura 1.11: Constituenții, produșii finali și mecanismul de stabilizare a cimenturilor osoase acrilice

Figura 1.12: Reacția de polimerizare metacrilatului de metil

Figura 1.13: Procesul de reducere-oxidare a BPO cauzat de DmpT

Figura 1.14: Formarea de radicali inițiali prin descompunerea BPO

Figura 1.15: Etapa de inițiere a polimerizării

Figura 1.16: Reacția de propagare în lanț

Figura 1.17: Finalizarea reacției de polimerizare prin recombinație

Figura 1.18: Temperaturi exoterme generate pentru cimentul osos din PMMA în condiții in vitro (ISO 5833) și in vivo

Figura 1.19: (a) Constrația volumului monomerului MMA, (b) Monomerul rezidual în cimenturile osoase de tip acrilic

Figura 1.20. Cimenturi comerciale: Surgical Simplex P, C-ment®, Palacos R, Fix 1, Fix 2, Aminofix 1 și Aminofix 2

Figura 1.21: (a) reprezentare schematică a unui eșantion testat prin îndoire în trei puncte; (b) exemplu de eșantion din ciment osos din PMMA supus testului

Figura 1.22 Componenta lichidă și componenta solidă a cimentului osos

Figura 1.23 Sistem de injectare a cimentului osos

Figura 1.24 Dispozitiv de amestec în vid

Figura 2.1. Schema analizei comparative in vitro a cimenturilor comerciale (Aminofix 1, Aminofix 3, Simplex P) utilizate în practica clinică pentru fixarea endoprotezelor de șold tip BHR la Spitalul Clinic Colentina București – cu indicarea metodelor de caracterizare

Figura 2.2 Schema cercetărilor efectuate pentru caracterizarea fizico-chimică a trei uleiuri esențiale cu proprietăți antibacteriene optime, utilizabil la dezvoltarea unor noi cimenturilor osoase antimicrobiene – cu indicarea metodelor de testare

Figura 2.3. Schema cercetărilor efectuate pentru caracterizarea efectului antimicrobian a trei uleiuri esențiale cu proprietăți antimicrobiene optime, utilizabil la dezvoltarea unor noi cimenturilor osoase antimicrobiene – cu indicarea metodelor de testare

Figura 2.4. Etapele obținerii unor noi cimenturi osoase cu proprietăți antimicrobiene

Figura 2.5. Etapele caracterizării morfologice și structurale și evaluarea proprietăților cimenturilor osoase noi cu proprietăți antimicrobiene – cu indicarea metodelor de caracterizare

Figura 2.6. Etapele evaluării activităților antimicrobiene a cimenturilor osoase noi – cu indicarea metodelor de testare

Figura 3.1. Procesul de obținere a probelor experimentale din ciment osos cu adaos de agenți antimicrobieni

Figura 3.2. Procesul de obținere a probelor experimentale din ciment osos cu adaos de agenți antimicrobieni

Figura 3.3. Reprezentarea schematică a microscopului electronic de baleiaj (SEM)

Figura 3.4. Principiul de construcție al spectrofotometru FT-IR de tip Jasco 600

Figura 3.5. Principiul de funcționare al spectroscopului Raman

Figura 3.6. Principiul de funcționare al EDXRD

Figura 3.7. probele analizate prin EDXRD și Spectroscopie Raman

Figura 3.8. Aspectul probelor înaintea determinării rezistenței la îndoire în 3 puncte

Figura 3.9. Extensometru inductiv

Figura 3.10. Test de duritate Shore D

Figura 3.11 Imagini reprezentative pentru unghiul de contact

Figura 3.12. Schema de lucru a unui Aparat de tip Drop Shape Analyzer DSA30 produs de firma KRÜSS GmbH

Figura 4.1 Evoluția utilizării endoprotezelor de tip BHR în cadrul Secției de Ortopedie a Spitalului Clinic Colentina

Fig.4.2. Distribuția pe categorii de vârstă a pacienților ce au suferit intervenții de artroplastie de resurfatare a șoldului cu endoproteze de tip BHR la Spitalul Clinic Colentina

Fig. 4.3. Cazurile de sex masculin (stânga) și cele de sex feminin (dreapta) care au suferit intervenții cu proteze tip BHR la Spitalul Clinic Colentina

Figura 4.4. Evoluția tipurilor de fixare adoptate de chirurgii ortopezi de la Spitalul Clinic Colentina în artroplastia de resurfatare de șold

Figura 4.5. Situație statistică privind producătorii cimenturilor osoase utilizate în artroplastia de resurfatare a șoldului în cadrul Spitalului Colentina

Figura 4.6. Regiunile de interes (1-3) utilizate pentru analiza grosimii și penetrării cimentului

Figura 4.7. Secțiune longitudinală prin explant de tip endoproteza de șold BHR a probei 1 (stânga), raportarea zonelor de interes 1-3 la secțiunea longitudinală (mijloc) și evidențierea defectelor (dreapta)

Figura 4.8. Secțiune longitudinală prin explant de tip endoproteza de șold BHR a probei 2 (stânga), raportarea zonelor de interes 1-3 la secțiunea longitudinală (mijloc) și evidențierea defectelor (dreapta)

Figura 4.9. Secțiune longitudinală prin explant de tip endoproteza de șold BHR a probei 3 (stânga), raportarea zonelor de interes 1-3 la secțiunea longitudinală (mijloc) și evidențierea defectelor (dreapta)

Figura 4.10 Imagini reprezentative SEM a neuniformităților existentelor la interfața ciment osos – proteză la probele 1 (a), 2 (b) și 3 (c) - la mărire de 100X

Figura 4.11. Cimenturile ortopedice utilizate pentru testare în sala de operații Aminofix 1, Amonofix 2 și Simplex P – Stryker Howmedica Osteonics

Figura 4.12. Aspecte privind manipularea cimenturilor osoase pentru fixarea clasică a protezei de șold: a) Aplicarea cimentului osos; b) Radiografie postoperatorie; c) Proteze de șold eșuate

Figura 4.13 Aspect privind manipularea cimenturilor osoase pentru fixarea protezei de șold de resurfactare (de ex. BHR): a) pregătirea osului, b) presiunea cimentului în componentele protetice; c) radiografie postoperatorie; d) Proteze de șold BHR eșuate

Figura 4.14 Imagine cu prepararea cimentului osos în interiorul capului femural înainte de introducerea componentei protezei în osul pregătit pentru endoproteza de șold tip BHR – conform instrucțiunilor producătorului

Figura 4.15. Imagini SEM reprezentative și spectre EDS corespunzătoare ale probei 1 (a), a probei 2 (b) și a probei 3 (c) investigate

Figura 4.16 Imagini cu picături de lichid pe suprafața materialelor: proba 1 (galben), proba 2 (albastru), proba 3 (roz)

Figura 4.17 Imagine a probelor 1 (galben), 2 (albastru) și 3 (roz), înainte și după încercarea de rezistență la compresiune (înainte de compresiune - stânga, după comprimare - dreapta)

Figura 4.18 Diagrama tensiune-deformație pentru probele 1 (a), 2 (b) și 3 (c)

Figura 4.19 Diagrama comparativa pentru încercarea la compresiune

Figura 4.20 Grafic comparative pentru modulul de elasticitate (a), pentru limita de curgere în compresiune (b) și pentru tensiunea maximă (c)

Figura 4.21 Imagine de stereomicroscopie pentru Proba 1(a) și pentru proba 2 (b) 2- x20 și proba 3 (c)

Figura 5.1. Spectrele uleiurilor esențiale de salvie(a), de mentă (b) și de brad (c) în hexan

Figura 5.2. Profilurile cromatografice ale celor trei uleiuri esențiale de salvie (a), mentă (b) și brad (c)

Fig. 5.3. Modul de dispunere a probelor pe suprafața mediului de cultură solid, inoculate în pânză cu suspensia bacteriană

Figura 5.4. Aspectul zonei de inhibiție manifestată de diferitele diluții de uleiuri esențiale față de tulpina Gram pozitivă *Staphylococcus aureus* ATCC25923

Figura 5.5. Aspectul zonei de inhibiție manifestată de diferitele diluții de esențiale esențiale față de tulpina Gram negativă *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853

Figura 5.6. Aspectul zonei de inhibiție manifestată de diferitele diluții de uleiuri esențiale față de tulpina levurică *C. albicans* ATCC 10231

Figura 5.7. Schema de realizare a diluțiilor binare seriialele compușilor testați și aspectul creșterii microbiene după etapa de incubare, în vederea determinării valorilor CMI

Figura 5.8. Repartizarea probelor în plăci cu 24 de godeuri și inocularea acestora în vederea determinării activității anti-aderență

Figura 5.9. Aspectul godeurilor colorate cu soluție cristal violet 1%, în vederea determinării valorilor CMEB prin citire spectrofotometrică la absorbanța de 490 nm

Figura 5.10. Reprezentarea grafică a valorilor CMEB pentru tulpina Gram pozitivă *S. aureus* ATCC 25923, valori stabilite în funcție de absorbanța la 490 nm

Figura 5.11. Reprezentarea grafică a valorilor CMEB pentru tulpina Gram negativă *P. aeruginosa* ATCC 27853, valori stabilite în funcție de absorbanța la 490 nm

Figura 5.12. Reprezentarea grafică a valorilor CMEB pentru tulpina levurică *C. albicans* ATCC 10231 valori stabilite în funcție de absorbanța la 490 nm

Figura 6.1. Imagine SEM a probei de referință R (400 X)

Figura 6.2. Imagine SEM reprezentativă (2000 X) și analiza EDX realizată pe diferite zone pentru proba de referință R

Figura 6.3. Imagine SEM a probei GM (400 X)

Figura 6.4. Imagine SEM reprezentativă (2000 X) și analiza EDX realizată pe diferite zone pentru proba GM

Figura 6.5. Imagine SEM a probei HUM (400 X)

Figura 6.6. Imagine SEM reprezentativă (2000 X) și analiza EDX realizată pe diferite zone pentru proba HUM

Figura 6.7. Imagine SEM a probei AM1 (400 X)

Figura 6.8. Imagine SEM reprezentativă (2000X) și analiza EDX realizată pe diferite zone pentru proba AM1

Figura 6.9. Imagine SEM a probei AM2 (400X)

Figura 6.10. Imagine SEM reprezentativă și analiza EDX realizată pe diferite zone pentru proba AM2

Figura 6.11. Spectrele FT-IR ale cimenturilor osoase

Figura 6.12. Modele Raman colectate pe eșantioanele studiate – realizate din PMMA-BaSO₄-BPO ca componente majore. Cele mai intense benzi au fost etichetate și atribuite componentei respective a cimentului osos

Figura 6.13. Spectrele EDXRD colectate pe probele analizate

Figura 6.14. Aspectul picăturilor formate pe suprafața

Figura 6.15. Diagrama valorilor unghiurilor de contact testate cu apă, di-iodometan (DIM) și etilen-glicol (EG)

Figura 6.16. Variația gradului de hidratare pe o perioadă de 21 de zile în apă distilată, la 37 °C, pentru probele experimentale

Figura 6.17. Variația ratei de degradare pe o perioadă de 28 de zile în apă distilată, la 37 °C, pentru probele experimentale

Figura 6.18. Aspecte morfologice relevate prin SEM și analiza elementală a suprafeței prin EDS a cimenturilor osoase experimentale PMMA după 28 de zile în SBF

Figura 6.19. Aspectul probelor înainte și după determinarea rezistenței la îndoire în 3 puncte

Figura 6.20. Diagrama cu rezultatele încercării la îndoire în trei puncte proba Referință (R)

Figura 6.21. Diagrama cu rezultatele încercării la îndoire în trei puncte proba CAM1

Figura 6.22. Diagrama cu rezultatele încercării la îndoire în trei puncte proba AM2

Figura 6.23. Diagrama cu rezultatele încercării la îndoire în trei puncte proba GH

Figura 6.24. Diagrama cu rezultatele încercării la îndoire în trei puncte proba HUM

Figura 6.25. Diagrama comparativă a încercărilor la îndoire în trei puncte

Figura 6.26. Diagrama cu rezultatele testării de compresiune pentru toate probele experimentale

Figura 6.27. Graficul durităților Shore D determinate pe cimenturile osoase experimentale

Figura 6.28. Scara de evaluare a durității Shore D

Figura 6.29. Media durităților Shore D determinate pe cele cinci cimenturi osoase experimentale

Figura 6.30 Evaluarea proprietăților antibacteriene pentru cimenturile osoase PMMA experimentale: (a) zona de inhibare a creșterii pentru tulpina Gram-pozitivă *Staphylococcus aureus* ATCC 2592; (b) zona de inhibare a creșterii pentru tulpina Gram-negativă *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, c) zona de inhibare a creșterii pentru tulpina *Candida albicans* ATCC 10231, după 72 de ore de incubație

Figura 6.31. Reprezentarea grafică a valorilor UFC/ml care evaluează gradul de dezvoltare a biofilmului microbial pe suprafața probelor de ciment osos testate

Figura 6.32. Testul MTT care arată viabilitatea celulelor MG-63 în prezența cimenturilor osoase PMMA experimentale după 24, 48 și 72 de ore

Figura 6.33. Imagini de fluorescență ale celulelor MG-63 colorate cu fluorofor CMTPX în prezența cimenturilor osoase PMMA experimentale

Figura 6.34.. Testul Alizarin Red care arată potențialul osteogenic al cimenturilor osoase PMMA experimentale pe celulele MG-63

Lista tabelelor

Tabelul 1.1. Proprietățile mecanice ale biomaterialelor utilizate în THA în comparație cu osul cortical ca țesut gazdă

Tabelul 1.2. Comparație între compoziție, proprietăți, aplicații și funcții ale cimenturilor osoase de tip acrilic și cimenturile osoase de tip fosfat de calciu

Tabelul 1.3 Constituenții cimentului osos

Tabelul 1.4: Listă cu diferiți ortofosfați de calciu

Tabelul 1.5: Componentele pulberii polimerice și ale lichidului din cimentul PMMA

Tabelul 1.6: Parametrii de stabilizare a unor cimenturi osoase acrilice comerciale

Tabelul 1.7: Tipuri de cimenturi osoase comerciale

Tabelul 1.8: Rezultatele testului la compresiune a cimentului osos Palacos R, conform standardului ISO5833, realizat la diferite intervale de timp după amestecare

Tabelul 1.9: Rezultatele testului la tracțiune a cimentului Palacos R, realizat la diferite intervale de timp după amestecare

Tabelul 1.10: Rezultatele testului la compresiune a unor diferite tipuri de cimenturi osoase comerciale, la 24 de ore după amestecare manuală (conform standardului ISO5833)

Tabelul 1.11: Creșterea rezistenței la compresiune datorită post-polimerizării a unor cimenturi osoase ce au rapoarte pulbere polimerică/monomer lichid diferite

Tabelul 3.1. Compoziția cimentului osos din PMMA utilizat ca referință (produs comercial)

Tabelul 3.2. Tulpinile bacteriene utilizate pentru evaluarea efectului antimicrobial

Tabelul 4.1. Indicații chirurgicale

Tabelul 4.2. Complicațiile postoperatorii care nu necesită o intervenție chirurgicală suplimentară

Tabelul 4.3. Modificări ale dimensiunilor endoprotezelor BHR

Tabelul 4.4. Rapoarte în vederea cimentarilor utilizate în artroplastia de resurfatare a soldului la Spitalul Clinic Colentina

Tabel 4.5. Proba.2 Evaluări ale zonelor de contact dintre cupa acetabulară și mantaua de ciment

Tabel 4.6. – Proba 3 Evaluări ale zonelor de contact dintre cupa acetabulară și mantaua de ciment acrilic

Tabelul 4.7. Valorile unghiului de contact pentru probele experimentale

Tabelul 4.8. Rezultatele încercării la compresiune pentru cimenturile osoase

Tabelul 5.1. Densitatea relativă a uleiurilor esențiale studiate

Tabelul 5.2. Indicele de refracție a uleiurilor esențiale studiate

Tabelul 5.3. Rotația optică a uleiurilor esențiale studiate

Tabelul 5.4. Reziduul la evaporare al uleiurilor esențiale studiate
 Tabelul 5.5. Compușii uleiului esențial de salvie
 Tabelul 5.6. Compușii uleiului esențial de mentă
 Tabelul 5.7. Compușii uleiului esențial de brad
 Tabelul 5.8. Activitatea antioxidantă al uleiurilor esențiale studiate
 Tabelul 5.9. Valorile CMI obținute prin metoda diluțiilor seriale binare în mediu lichid
 Tabelul 6.1. Atribuirea deplasărilor Raman
 Tabelul 6.2. Atribuțiile vârfurilor deconvolute EDXRD
 Tabelul 6.3 Valorile unghiurilor de contact cimenturilor osoase caracterizate
 Tabelul 6.4. Valorile energiei libere de suprafață calculată prin metoda Girifalco&Good
 Tabelul 6.5. Valorile energiei libere de suprafață calculată prin metoda geometriei
 Tabelul 6.6. Parametrii de hidratare (Ha) și degradare (Ew) pentru proba de referință
 Tabelul 6.7. Parametrii de hidratare (Ha) și degradare (Ew) pentru proba GM
 Tabelul 6.8. Parametrii de hidratare (Ha) și degradare (Ew) pentru proba HUM
 Tabelul 6.9. Parametrii de hidratare (Ha) și degradare (Ew) pentru proba AM1
 Tabelul 6.10 Parametrii de hidratare (Ha) și degradare (Ew) pentru proba AM2
 Tabelul 6.11 Rezultatele încercării la îndoire în trei puncte proba Referință (R)
 Tabelul 6.12 Rezultatele încercării la îndoire în trei puncte proba AM1
 Tabelul 6.13 Rezultatele încercării la îndoire în trei puncte proba AM2
 Tabelul 6.14 Rezultatele încercării la îndoire în trei puncte proba GH
 Tabelul 6.15 Rezultatele încercării la îndoire în trei puncte proba HUM
 Tabelul 6.16 Rezultatele testelor de compresiune pentru cimenturile osoase experimentale
 Tabelul 6.17 Valorile durităților Shore D determinate pe cimenturile osoase experimentale

Lista abrevierilor

AFS - Apă fiziologică sterilă
 BHR - Endoproteză Birmingham Hip Resurfacing
 BMA –Metacrilat de butyl
 BPO - Peroxid de benzoil
 CDHA - Hidroxiapatita non-stoechiometrică sau cu deficit de calciu
 CMEB –Concentrație minima de eradicare a biofilmelor
 CMI - Concentrație minima inhibitorie
 CPC - Cimenturile de tip fosfat de calciu
 DCP - Monetită
 DCPD - Brușită
 DmpT - Dimetil-p-toluidină
 EDS – Spectroscopie de raze X cu dispersie de energie
 EDXRD - Difrakție de raze X cu dispersie de energie
 EtO - Oxid de etilenă
 FT-IR - Spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier)
 HQ – Hidrochinona
 HV – Ciment cu vascozitate ridicata
 LPPO II - Lipofosfonoxinele de a doua generație
 LV - Ciment cu vâscozitate scăzută
 MC - Colagen mineralizat
 MCP - Fosfatul monocalcic anhidru
 MCPM - Fosfat monocalcic monohidrat

MMA - Metacrilatul de metil
 MRSA – Staphylococcus aureus rezistent la metilina
 MRSE – Staphylococcus.epidermidis rezistent la metilina
 MTT - Metabolizarea sărurilor de tetrazolium(SERVA Electrophoresis GmbH)
 PBMA -Polimetacrilat de butyl
 PBS - Soluție salină tampon fosfat
 PC - Fosfatidilcolină
 PHA - Hidroxiapatită precipitată
 PI - Iodura de propidiu
 PMMA- Polimetilmetacrilatul
 SBF - fluidul fiziologic simulat
 SEM - Microscopie electronică de baleiaj
 THA - Artroplastia totală de șold
 THR – Inlocuirea totala a articulatie soldului
 TTCP - Fosfat tetracalcic
 UHMWPE - Polietilena cu greutate moleculară ultra-înaltă
 ZTA – Zirconia durificata cu alumina

Bibliografie selectivă

1. Lewis, G. *Properties of Acrylic Bone Cement: State of the Art Review*; John Wiley & Sons, 1997; Vol. 38;.
2. Pina, S.; Oliveira, J.M.; Reis, R.L. Natural-Based Nanocomposites for Bone Tissue Engineering and Regenerative Medicine: A Review. *Advanced Materials* 2015, 27, 1143–1169.
3. Fukuda, N.; Tsuru, K.; Mori, Y.; Ishikawa, K. Fabrication of Self-Setting β -Tricalcium Phosphate Granular Cement. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials* **2018**, 106, 800–807, doi:10.1002/jbm.b.33891.
4. Xu, S.; Liu, J.; Zhang, L.; Yang, F.; Tang, P.; Wu, D. Effects of HAp and TCP in Constructing Tissue Engineering Scaffolds for Bone Repair. *Journal of Materials Chemistry B* **2017**, 5, 6110–6118, doi:10.1039/c7tb00790f.
5. Johnston, R.C.; Fitzgerald, R.H.; Harris, W.H.; Poss, R.; Müller, M.E.; Sledge, C.B. Clinical and Radiographic Evaluation of Total Hip Replacement. A Standard System of Terminology for Reporting Results. *J Bone Joint Surg Am* **1990**, 72, 161–168.
6. Wang, H.V.; Johnston, S.R.; Fellow, P.; Rosen, D.W. *DESIGN OF A GRADED CELLULAR STRUCTURE FOR AN ACETABULAR HIP REPLACEMENT COMPONENT*;
7. Ma, Y.; Cao, X.; Feng, X.; Ma, Y.; Zou, H. Fabrication of Super-Hydrophobic Film from PMMA with Intrinsic Water Contact Angle below 90°. *Polymer (Guildf)* **2007**, 48, 7455–7460, doi:10.1016/j.polymer.2007.10.038.
8. Brugnara, M.; Volpe, C. della; Siboni, S.; Zeni, D. Contact Angle Analysis on Polymethylmethacrylate and Commercial Wax by Using an Environmental Scanning Electron Microscope. *Scanning* **2007**, 28, 267–273, doi:10.1002/sca.4950280504.
9. Josse, J.; Valour, F.; Maali, Y.; Diot, A.; Batailler, C.; Ferry, T.; Laurent, F. Interaction Between Staphylococcal Biofilm and Bone: How Does the Presence of Biofilm Promote Prosthesis Loosening? *Frontiers in Microbiology* **2019**, 10, doi:10.3389/fmicb.2019.01602.
10. Cotar, A.I.; Grumezescu, A.M.; Andronescu, E.; Voicu, G.; Ficai, A.; Ou, K.L.; Huang, K.S.; Chifiriuc, M.C. Nanotechnological Solution for Improving the Antibiotic Efficiency against Biofilms Developed by Gram-Negative Bacterial Strains. *Letters in Applied NanoBioScience* **2013**, 2, 97–104.
11. Tan, H.; Peng, Z.; Li, Q.; Xu, X.; Guo, S.; Tang, T. The Use of Quaternised Chitosan-Loaded PMMA to Inhibit Biofilm Formation and Downregulate the Virulence-Associated Gene

- Expression of Antibiotic-Resistant Staphylococcus. *Biomaterials* **2012**, *33*, 365–377, doi:10.1016/j.biomaterials.2011.09.084.
12. Cavalu, S.; Antoniac, I.V.; Fritea, L.; Mates, I.M.; Milea, C.; Laslo, V.; Vicas, S.; Mohan, A. Surface Modifications of the Titanium Mesh for Cranioplasty Using Selenium Nanoparticles Coating. *Journal of Adhesion Science and Technology* **2018**, *32*, 2509–2522, doi:10.1080/01694243.2018.1490067.
 13. Cavalu, S.; Ratiu, C.; Ponta, O.; Simon, V.; Rugina, D.; Miclaus, V.; Akin, I.; Goller, G. *IMPROVING OSSEOINTEGRATION OF ALUMINA/ZIRCONIA CERAMIC IMPLANTS BY FLUORIDE SURFACE TREATMENT*; Vol. 9;.
 14. Leyva-López, N.; Gutiérrez-Grijalva, E.; Vazquez-Olivo, G.; Heredia, J. Essential Oils of Oregano: Biological Activity beyond Their Antimicrobial Properties. *Molecules* **2017**, *22*, 989, doi:10.3390/molecules22060989.
 15. Brđjanin, S.; Bogdanovic, N.; Kolundzic, M.; Milenkovic, M.; Golic, N.; Kojic, M.; Kundakovic, T. Antimicrobial Activity of Oregano (*Origanum Vulgare* L.): And Basil (*Ocimum Basilicum* L.): Extracts. *Advanced technologies* **2015**, *4*, 5–10, doi:10.5937/savteh1502005B.
 16. Karadayı, M.; Yıldırım, V.; Güllüce, M. *Antimicrobial Activity and Other Biological Properties of Oregano Essential Oil and Carvacrol*; 2020;
 17. Evangelopoulou, G.; Solomakos, N.; Ioannidis, A.; Pexara, A.; R Burriel, A. A Comparative Study of the Antimicrobial Activity of Oregano, Rosemary and Thyme Essential Oils against *Salmonella* Spp. *Biomedical Research and Clinical Practice* **2019**, *4*, doi:10.15761/BRCP.1000197.
 18. Leonelli Pires de Campos, A.C.; Saldanha Nandi, R.D.; Scandorieiro, S.; Gonçalves, M.C.; Reis, G.F.; Dibo, M.; Medeiros, L.P.; Panagio, L.A.; Fagan, E.P.; Takayama Kobayashi, R.K.; et al. Antimicrobial Effect of *Origanum Vulgare* (L.) Essential Oil as an Alternative for Conventional Additives in the Minas Cheese Manufacture. *LWT* **2022**, *157*, 113063, doi:10.1016/j.lwt.2021.113063.
 19. Brđanin, S.; Bogdanović, N.; Kolundžić, M.; Milenković, M.; Golić, N.; Kojić, M.; Kundaković, T. *Advanced Technologies 4(2) ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF OREGANO (Origanum Vulgare L.) AND BASIL (Ocimum Basilicum L.) EXTRACTS*; 2015;
 20. Simirgiotis, M.J.; Burton, D.; Parra, F.; López, J.; Muñoz, P.; Escobar, H.; Parra, C. Antioxidant and Antibacterial Capacities of *Origanum Vulgare* L. Essential Oil from the Arid Andean Region of Chile and Its Chemical Characterization by Gc-Ms. *Metabolites* **2020**, *10*, 1–12, doi:10.3390/metabo10100414.
 21. Fournomiti, M.; Kimbaris, A.; Mantzourani, I.; Plessas, S.; Theodoridou, I.; Papaemmanouil, V.; Kapsiotis, I.; Panopoulou, M.; Stavropoulou, E.; Bezirtzoglou, E.E.; et al. Antimicrobial Activity of Essential Oils of Cultivated Oregano (*Origanum Vulgare*), Sage (*Salvia Officinalis*), and Thyme (*Thymus Vulgaris*) against Clinical Isolates of *Escherichia Coli*, *Klebsiella Oxytoca*, and *Klebsiella Pneumoniae*. *Microbial Ecology in Health & Disease* **2015**, *26*, doi:10.3402/mehd.v26.23289.
 22. Lu, M.; Dai, T.; Murray, C.K.; Wu, M.X. Bactericidal Property of Oregano Oil Against Multidrug-Resistant Clinical Isolates. *Frontiers in Microbiology* **2018**, *9*, doi:10.3389/fmicb.2018.02329.
 23. Coccimiglio, J.; Alipour, M.; Jiang, Z.-H.; Gottardo, C.; Suntres, Z. Antioxidant, Antibacterial, and Cytotoxic Activities of the Ethanolic *Origanum Vulgare* Extract and Its Major Constituents. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2016**, *2016*, 1–8, doi:10.1155/2016/1404505.