University of Mosul

College of Dentistry

Biological Response of Bone Augmented with Injectable Platelet-Rich Fibrin and Silver/β-Tricalcium Phosphate Nanocomposite. (Experimental Study on Dogs)

A Dissertation Submitted

by

Alyaa Ismael Naser Ismael

to

The Council of the College of Dentistry

Mosul University

as a Partial Fulfilment of Requirements

for the Degree of Philosophy Doctorate

in

Dental Sciences

Supervised by

Assist. Prof. Dr.

Rayan Salim Hamed

Prof. Dr.

Ghada Abd Al-Rahman Taqa

1445 A.H **2024A.D**

ABSTRACT

BACKGROUND: Modern biomedicine and biotechnology aim to provide functional alternatives for the precise, targeted, and accurate management of medical complications through the advance of integrated solutions utilizing medical, biotechnological, and technical concepts. An example of this integration involves introducing silver nanomaterial into beta-tricalcium phosphate granules, thereby contributing to the advancement of bone substitute materials.

AIMS and Objectives: The aims of the current study were preparation and characterization of silver nanoparticle-decorated Beta-tricalcium phosphate nanocomposite. Furthermore, assessment of biological activity of nanocomposite on bone healing microstructure alone or mixed with injectable platelet-rich fibrin in surgically created bone defects in the mandible of dogs as assessed by biochemical, radiological, histological, and immunohistochemical examinations. In addition to evaluate the antibacterial effect of locally synthesized silver nanoparticle-decorated Beta-tricalcium phosphate nanocomposite in vitro.

MATERIALS and METHODS: The study included both a pilot and study proper section. The pilot study was for the chemical preparation and characterization of silver nanoparticle-decorated Beta-tricalcium phosphate nanocomposite. The study proper included antibacterial and experimental parts. For antibacterial assessment of the prepared nanocomposite, broth dilution method was followed, after culturing of *Staphylococcus aureus* on Mueller-Hinton agar. The experimental part included eighteen healthy adult male local breed dogs aged 12-18 months, weighing 15-20 kg were used in the study. For the preparation of injectable platelet rich-fibrin, a total of 2 *10 ml of blood was collected from the jugular vein of each dog and immediately centrifuged at 700 rpm for 3 minutes. Based on healing intervals of 1 and 2 months, the dogs were

divided into 2 groups. Each interval group had 6 subgroups based on the grafting material used to fill the created defect with 3 dogs each, these included: an empty defect, beta- tricalcium phosphate, nanocomposite, injectable platelet rich-fibrin, beta- tricalcium phosphate with injectable platelet rich-fibrin, and nanocomposite with injectable platelet rich-fibrin. Surgery started after the dogs were anaesthetized. The surgical procedure began with a 5 cm parallel incision on the left, lower posterior border of the mandible for one-month intervals and right side for two-month intervals. After exposing the periosteum, three 5mm-diameter, 5-mm-deep critical-size holes were made, 5mm between each one. Each group's grafting material had independent 3 holes. All defects for all groups were covered with resorbable collagen membranes followed by suturing of the subcutaneous tissue and the skin. After completion of the scheduled surgery timetable of the study for each dog, animals were euthanized, and then the mandibular bone was harvested and exposed to x-ray (cone beam computed tomography) for radiological analysis. Bone samples were fixed in 10% formaldehyde, the block sections were decalcified in 5% nitric acid for about 24 hours, followed by 5% formic acid for histological and immunohistochemical analysis.

RESULTS: The results of the pilot study for chemical preparation of nanocomposite study material showed successful loading of nanosilver on beta-tricalcium phosphate and formation of silver/beta-tricalcium phosphate nanocomposite with high crystallinity and thermal stability with antibacterial properties. Radiological assessment showed that the nanocomposite material increased bone density after being mixed with injectable platelet-rich fibrin along the study interval. These results were corroborated by histological examination, which showed that the nanocomposite material enhanced osteoblastic activity, promoted osteogenesis, decreased inflammatory response, and elevated bone marker runt-associated transcription factor 2 expression.

Furthermore, the substance of the nanocomposite promoted angiogenesis by upregulating the expression of vascular endothelial growth factor along study intervals.

CONCLUSIONS: The addition of nanosilver to beta-tricalcium phosphate provided antimicrobial characteristics, which may be useful in biological applications. Silver/beta-tricicalcium phosphate nanocomposite had a significant radiological effect on bone mineral density via cone beam computed tomography modality after two-month intervals. Histologically, synthetic silver/beta-tricalcium phosphate nanocomposite and beta-tricalcium phosphate groups increased bone formation after the addition of injectable platelet-rich fibrin concentrate along study intervals. Immunohistochemically, synthetic silver/beta-tricicalcium phosphate nanocomposite accelerated bone healing when used alone or after the addition of injectable platelet-rich fibrin concentrates.

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة الموصل
كلية طب الاسنان

الاستجابة الحيوية للبدائل العظمية النانوية (الفضة /بيتا - ثلاثي فوسفات الكالسيوم المركب النانوي) المعززة بالليفين القابل للحقن والغني بالصفيحات الدموية.
(دراسة تجريبية على الكلاب)

اطروحة تقدمت بها

علياء اسماعيل ناصر اسماعيل

الى
مجلس كلية طب الاسنان
جامعة الموصل
كجزء من متطلبات نيل شهادة
دكتوراه فلسفة في علوم طب الاسنان

بإشراف

الاستاذ المساعد الدكتور
ريان سالم حامد

الاستاذ الدكتورة
غادة عبدالرحمن طاقة

1445هـ
2024م

الخلاصة

الخلفية: يهدف الطب الحيوي الحديث والتكنولوجيا الحيوية إلى تطوير حلول متكاملة تستخدم المفاهيم الطبية والتكنولوجية الحيوية والهندسية لإنشاء بدائل وظيفية لإدارة محددة وانتقائية ودقيقة للحالات الطبية. وشمل هذا التكامل إدخال مادة الفضة النانوية في حبيبات بيتا ثلاثي فوسفات الكالسيوم ، مما ساهم في تطوير المواد البديلة للعظام.

الأهداف: أهداف الدراسة الحالية هي:**1.**تحضير وتوصيف مركب بيتا ثلاثي فوسفات الكالسيوم النانوي المزخرف بجسيمات الفضة النانوية.**2**. تقييم النشاط البيولوجي للمركب النانوي على البنية المجهرية لشفاء العظام بمفرده أو ممزوجًا بالليفين القابل للحقن والغني بالصفيحات الدموية في عيوب العظام التي تم إنشاؤها جراحيًا في الفك السفلي للكلاب وفقًا لتقييم الفحوصات الكيميائية الحيوية والجينومية والإشعاعية والنسيجية والكيميائية المناعية. **3**. تقييم التأثير المضاد للبكتيريا لمركب بيتا ثلاثي فوسفات الكالسيوم النانوي المصنّع محلياً والمزخرف بجسيمات الفضة النانوية في المختبر.

المواد والطرق: اشتملت الدراسة على قسمين دراسة تجريبية ودراسة اساسية. كانت الدراسة التجريبية تتضمن تحضير وتوصيف الكيميائي لمركب بيتا ثلاثي فوسفات الكالسيوم النانوي المزخرف بجسيمات الفضة النانوية. ايضا شملت الدراسة التجريبية قياس تاثيرالمضاد للبكتريا للمركب النانوي المحضر. لتقييم مضادات البكتيريا للمركب النانوي المحضر، تم اتباع طريقة تخفيف المرق بعد زراعة المكورات العنقودية الذهبية على أجار مولر-هينتون. كانت الدراسة الاساسية /الجزء العملي على الكلاب. لتحضير الليفين القابل للحقن والغني بالصفيحات الدموية ، تم جمع ما مجموعه 2 * 10 مل من الدم من الوريد الوداجي الكلاب في انبيوبين من البلاستيك، تم وضعهم في جهاز الطرد المركزي بسرعة 700 دورة في الدقيقة لمدة 3 دقائق. من أجل التحليل النسيجي لليفين القابل للحقن والغني بالصفيحات الدموية ، تم وضع بضع قطرات على الشريحة الزجاجية وتركها تجف في درجة حرارة الغرفة ثم صبغت بالهيماتوكسيلين وصبغة الأيوسين للقراءة النسيجية. تم استخدام ثمانية عشر كلباً من السلالات المحلية من الذكور الأصحاء، تتراوح أعمارهم بين سنة وسنة ونصف، وتراوحت أوزانهم بين 15-20 كجم. بناءً على فترات الشفاء التي تتراوح بين شهر وشهرين، تم تقسيم الكلاب إلى مجموعتين. كان لكل مجموعة 6 مجموعات فرعية تضم كل منها 3 كلاب.حيث تم اعتماد التقسيم على مادة التطعيم المستخدمة لملء العيب الناتج: عيب فارغ، بيتا ثلاثي فوسفات الكالسيوم ، مركب نانوي، الليفين

القابل للحقن والغني بالصفيحات الدموية ، بيتا ثلاثي فوسفات الكالسيوم مع الليفين القابل للحقن والغني بالصفيحات الدموية ، ومركب نانوي مع الليفين القابل للحقن والغني بالصفيحات الدموية. بدأت الجراحة بعد تخدير الكلاب بعمل شق متوازي بطول 5 سم على الحافة الخلفية اليسرى السفلية للفك السفلي للكلاب لمدة شهر واحد وفي الجانب الأيمن لمدة شهرين. بعد تعريض السمحاق، تم عمل ثلاثة ثقوب ذات حجم حرج بقطر 5 مم وعمق 5 مم ومسافة 5مم بين ثقب واخر. تحتوي مادة التطعيم الخاصة بكل مجموعة على 3 ثقوب مستقلة. تمت تغطية العيوب بأغشية كولاجين قابلة للامتصاص متبوعة بخياطة السديلة المخاطية السمحاقية. بعد الانتهاء من الجدول الزمني للجراحة المقررة للدراسة لكل كلب، تم القتل الرحيم للحيوانات، ثم تم اخذ عظم الفك السفلي وتعريضه للأشعة السينية (التصوير المقطعي المحوسب بالحزمة المخروطية) للتحليل الإشعاعي. تم تثبيت عينات العظام في 10٪ من الفورمالديهايد، وتم إزالة الكلس من المقاطع الكتلية في 5٪ من حمض النيتريك لمدة 24 ساعة تقريبًا، يليها 5٪ من حمض الفورميك للتحليل النسيجي والكيميائي المناعي.

النتائج: نتائج الدراسة التجريبية للتحضير الكيميائي لمادة الدراسة النانوية من خلال طريقة الاختزال الكيميائي والتكليس الحراري واختبارات التوصيف لإنتاج مادة مركبة نانوية، أظهرت تحميل ناجح للفضة النانوية على بيتا ثلاثي فوسفات الكالسيوم وتكوين مركب نانوي من الفضة/ بيتا ثلاثي فوسفات الكالسيوم مع بلورة عالية وثبات حراري مع خاصية مضادة للبكتيريا. أظهر التقييم الإشعاعي أن المادة المركبة النانوية زادت من كثافة العظام بعد مزجها مع الليفين الغني بالصفيحات الدموية القابل للحقن طوال فترة الدراسة. تم تأكيد هذه النتائج من خلال الفحص النسيجي، الذي أظهر أن المادة المركبة النانوية زادت من نشاط الخلايا المكونة للعظم، وعززت التكوين الجديد العظم، وانخفضت الاستجابة الالتهابية، وارتفاع عامل النسخ المرتبط بعامل النسخ 2. علاوة على ذلك، عززت مادة المركب النانوي تكوين الأوعية الدموية عن طريق تنظيم التعبير عن عامل نمو بطانة الأوعية الدموية على طول فترات الدراسة.

الاستنتاجات: يمكن تحضير بديل العظام الاصطناعي (الفضة/ بيتا ثلاثي فوسفات الكالسيوم مركب نانوي) بنجاح من بيتا ثلاثي فوسفات الكالسيوم ومعدن الفضة عن طريق الاختزال الكيميائي وطريقة التكليس الحراري التي كشف عنها تقييم التوصيف الذي أظهر تبلورًا عاليًا مع تحسن في الثبات الحراري بيتا ثلاثي فوسفات الكالسيوم ويمنع تحول الطور من بيتا ثلاثي فوسفات الكالسيوم إلى الفا ثلاثي فوسفات الكالسيوم. توفر أطياف الأشعة تحت الحمراء لتحويل فورييه رؤى قيمة حول التفاعلات الكيميائية والتعديلات الهيكلية التي تحدث أثناء تكوين مركب

الفضة/ بيتا ثلاثي فوسفات الكالسيوم النانوي الذي يعكس نطاقات امتصاص متميزة للمكونات الفردية، ويسلط الضوء على التوليف الفعال للمركب النانوي ويمهد الطريق لـ التطبيقات المحتملة في مختلف المجالات. أدت إضافة الفضة النانوية إلى المركب النانوي إلى توفير خصائص مضادة للبكتريا، والتي قد تكون مفيدة في التطبيقات البيولوجية. كان لمركب الفضة/ بيتا ثلاثي فوسفات الكالسيوم النانوي تأثير إشعاعي كبير على تحسين كثافة العظام من خلال طريقة التصوير المقطعي المحوسب بالحزمة المخروطية بعد فترة شهرين. من الناحية النسيجية، أدت مجموعات بيتا ثلاثي فوسفات الكالسيوم النانو المركبة الاصطناعية بيتا ثلاثي فوسفات الكالسيوم إلى زيادة تكوين العظام بعد إضافة مركز الليفين القابل للحقن والغني بالصفيحات الدموية على طول فترات الدراسة. من الناحية الكيميائية المناعية، تعمل مركبات الفضة / بيتا ثلاثي فوسفات الكالسيوم النانوية الاصطناعية على تسريع شفاء العظام عند استخدامها بمفردها أو بعد إضافة مركز الليفين القابل للحقن والغني بالصفيحات الدموية.