
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Dezvoltarea de noi biomateriale poroase utilizate în regenerarea osoasa ghidată

Doctorand **Ioana Codruta Mirică**

Conducător de doctorat Prof.dr. **Radu Septimiu Câmpian**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	13
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	
1. Regenerarea osoasă ghidată	17
2. Grefa osoasă	19
3. Proprietățile membranei ideale cu aplicabilitate în regenerarea osoasă ghidată	23
3.1. Integrare tisulară	24
3.2. Ocluziune celulară	24
3.3. Manevrabilitate clinică	25
3.4. Menținător de spațiu	26
3.5. Biocompatibilitatea	26
4. Generațiile de membrane	27
4.1. Generația a I-a de membrane	27
4.2. Generația a II-a de membrane	29
4.2.1. Membrane din polimeri naturali	30
4.2.2. Membrane din polimeri sintetici	31
4.3. Generația a III-a de membrane	31
4.3.1. Membrane cu activitate antimicrobiană	32
4.3.2. Membrane cu conținut de fosfat de calciu bioactiv	34
4.3.3. Membrane eliberatoare de compuși antimicrobieni și ceramici	35
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	
1. Ipoteza de lucru/obiective	39
2. Studiul 1 - Obținerea și caracterizarea nano-hidroxiapatitei	41
2.1. Introducere	41
2.2. Ipoteza de lucru/obiective	42
2.3. Material și metodă	43
2.4. Rezultate	45
2.5. Discuții	48
2.6. Concluzii	49
3. Studiul 2 - Caracterizarea structurală și a comportamentului mecanic al noilor membrane obținute cu conținut variabil de nano-hidroxiapatitei și 20% wt. metronidazol	51
3.2. Ipoteza de lucru/obiective	53
3.3. Material și metodă	54

3.4. Rezultate	60
3.5. Discuții	71
3.6. Concluzii	73
4. Studiul 3- Caracterizarea structurală și a proprietăților mecanice a membranelor obținute cu conținut de nano- hidroxiapatitei și 5% wt. metronidazol	75
4.1. Introducere	75
4.2. Ipoteza de lucru/obiective	77
4.3. Material și metodă	77
4.4. Rezultate	81
4.5. Discuții	91
5.6. Concluzii	92
6. Discuții generale	95
7. Concluzii generale	97
8. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	99
REFERINȚE	101

Cuvinte cheie: regenerare osoasă ghidată, nano-hidroxiapatită, metronidazol, policaprolactonă, membrane eliberatoare de de compuși antimicrobieni și ceramici

INTRODUCERE

Regenerarea osoasă ghidată se bazează pe principiile regenerării tisulare ghidate, și are ca scop final reconstrucția volumului osos pierdut cu intenția finală de inserare a implantelor endo-osoase într-un volum osos adecvat care să înconjoare complet suprafața implantului, a cărui plasare are loc într-o poziție optimă pentru reabilitarea protetică finală. Aceasta tehnică chirurgicală folosește principiul de compartimentare, asigurând un spațiu delimitat de către o membrană de barieră, care să împiedice pătrunderea celulelor din vecinătate, cu proliferare rapidă și să faciliteze dezvoltarea și multiplicarea celulelor osteoprogenitoare. Rolul unei membrane în regenerarea osoasă ghidată este triplu, și constă în exercitarea funcției de barieră fizică pentru menținerea granulelor grefei osoase în situ în timpul și după sutura țesuturilor moi supriacente; prevenirea invaziei celulelor epiteliale; și delimitarea unui spațiu în care regenerarea osoasă să poată avea loc. În prezent regenerarea osoasă ghidată, implică utilizarea diferitelor tipuri de membrană (rezorbabilă și nerezorbabilă) în combinație cu diferite materiale de adiție osoasă. Principala cauză de esec a regenerării osoase ghidate constă în apariția infecțiilor locale, în ciuda administrării sistemice, îndelungate a antibioticelor cu spectru larg. Începutul noului mileniu a fost caracterizat, de cea mai largă dezvoltare a dispozitivelor medicale în toate ramurile medicinei. Din aceasta cauză pe măsura dezvoltării conceptul de inginerie tisulară, a apărut necesitatea de reevaluarea a membranele utilizate în regenerarea osoasă ghidată. Astfel au început să fie descrise în literatura de specialitate, membranele de generația a III-a, care acționează nu numai ca și bariere, dar și ca dispozitive eliberatoare de agenți terapeutici sau bioactivi. Acestea pot elibera compuși specifici, cum ar fi antibiotice, local, într-un timp predefinit pentru a susține o vindecare naturală, superioară a plăgii și a mări șansele de reușită a reconstrucției osoase. Necesitatea acestui studiu vine din dorința de a ajuta atât pacienții, cât și practicienii, punându-le la dispoziție o membrană nouă, inovatoare, de generația a III-a, cu un preț de cost scăzut.

Astfel cercetarea propusă și-a dorit dezvoltarea unei membrane încărcată cu metronidazol, care să faciliteze o eliberare lentă, continuă a substanței active asigurând astfel o protecție locală a plăgii postoperatorii, evitând toate efectele adverse ale administrării sistemice. Înglobarea de nano-hidroxiapatită în interiorul fibrei membranei, va conferi bioactivitate prin stimularea biomineralizării, dar și transformarea celulelor stem mezenchimale nediferențiate în osteoblaste. Procedul de obținere, precum și precursorii membranei fiind foarte ieftini va conduce la obținerea unei produs, cu un cost redus, care să înlocuiască utilizarea antibioterapei sistemice, facilitând astfel și

accesul persoanelor defavorizate la această opțiune terapeutică. Caracterul rezorbabil al membranei aduce avantajul de eliminare a intervenției chirurgicale de înlăturare a acesteia, scăzând costurile, timpul de vindecare, precum și evitarea apariției unei infecții locale. O astfel de membrană nu este disponibilă momentan pe piața, ea fiind descrisă numai în literatura de specialitate.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Obiectivul prezentei teze a fost acela de a dezvolta și caracteriza noi membrane, care să reprezinte o alternativă a membranelor utilizate în acest moment în regenerarea osoasă ghidată. Astfel s-au obținut prin procedeul de electrospinning membrane rezorbabile, din policaprolactonă cu conținut variabil de nano-hidroxiapatită și metronidazol. Cunoscut fiind faptul că succesul regenerării osoase ghidate este influențat de absența infecției locale, dar și de către bioactivitatea grefei osoase utilizate. În acest sens au fost urmărite o serie de perspective:

- (i) obținerea prin sinteză a nano-hidroxiapatitei;
- (ii) caracterizarea structurală și chimică a nano-hidroxiapatitei obținute;
- (iii) caracterizarea structurală a compușilor organici: policaprolactonă, metronidazol;
- (iv) obținerea noilor membranelor cu aplicabilitate în regenerarea osoasă ghidată;
- (v) caracterizarea structurală a noilor membranelor obținute;
- (vi) evaluarea proprietăților mecanice a membranelor obținute;
- (vii) testarea citotoxicității;
- (viii) evaluarea bioactivității membranelor cu conținut de nano-hidroxiapatită;

Studiu 1. Obținerea și caracterizarea nano-hidroxiapatitei

Introducere. Studiul s-a realizat cu scopul de a sintetiza un nou tip de nano-hidroxiapatită, care să poată fi înglobată în matricea polimerică de PCL, ducând la obținerea unei noi membrane hibride cu aplicație biomedicală.

Material și metodă. Nano-hidroxiapatita a fost obținută printr-o metodă de precipitare chimică umedă, utilizând precursori ai calciului și fosforului. Pulberea obținută a fost supusă analizei de difracției cu raze X, spectroscopiei de raze X prin dispersie de energie și prin microscopia electronică de transmisie pentru evaluarea cristalinității și a mărimii particulelor. S-au realizat două sinteze.

Rezultate. Difrakției cu raze X a arătat o dimensiune medie a cristalitei de 35,3 nm. Spectroscopiei de raze X prin dispersie de energie a confirmat faptul că pulberea obținută este hidroxiapatită. Imaginiile de microscopie electronică de transmisie au evidențiat obținerea unor particule de nano-hidroxiapatită aciculare, care au prezentat o dimensiune în medie de 33,74 nm ($\pm 9,56$ SD) în sinteza I, respectiv cu valori de 31,49 nm ($\pm 9,75$ SD) (Fig. 6) în sinteza II.

Concluzii. S-a obținut nano-hidroxiapatită cu aplicație biomedicală.

Studiu 2. Caracterizarea structurală și a comportamentului mecanic al noilor membrane obținute cu conținut variabil de nano-hidroxiapatită și 20% metronidazol

Introducere. Acestui studiu a dorit obținerea unor membrane de generația a III-a cu conținut variabil de nano-hidroxiapatita și 20% metronidazol prin procedeul de electrospinning cu aplicabilitate în regenerarea osoasă ghidată.

Materiale și metodă. Patru tipuri diferite de membrane s-au propus a fi obținute, utilizând ca și precursori policaprolactonă, metronidazolul, nano-hidroxiapatita (sintetizată în studiul I), diclormetan și dimetilformamidă. S-a utilizat un aparat de electrospinning construit experimental. Membranele obținute au fost supuse următoarelor investigații: Spectroscopie în infraroșu cu reflectanță totală atenuată, microscopia optică, microscopia electronica de baleaj, testarea citotoxicității, teste mecanice. Analiza statistică a fost realizată cu ajutorul analizei unice a varianței (ANOVA) și prin testul lui Tukey cu nivelul de semnificație stabilit la 0,05.

Rezultate. Spectroscopie în infraroșu cu reflectanță totală atenuată nu a indicat formarea a unei noi faze cristaline sau noile modificări ale fazelor cristaline au fost prea mici pentru a crea un semnal ridicat. Imaginiile de microscopie optică au arătat o porozitate diferită în funcție de compoziție. Imaginile de microscopie de baleaj au prezentat fibre orientate aleatoriu fără conglomerari, construind o structură poroasă cu macropori interconectați. Nici una dintre compoziții nu a prezentat citotoxicitate, iar proprietățile mecanice ale membranelor obținute experimental au fost similare cu cele comerciale, descrise în literatura de specialitate.

Concluzii. Noile membrane experimentale ar putea fi materiale promițătoare pentru regenerarea osoasă ghidată sau alte aplicații de inginerie tisulară. Aceste rezultate ne încurajează să continuăm investigațiile *in vitro* și *in vivo* pentru aplicarea clinică a acestora.

Studiu 3. Caracterizarea structurală și a comportamentului mecanic al noilor biomateriale poroase obținute cu conținut de nano-hidroxiapatită și 5% wt. metronidazole

Introducere. Acest studiu a dorit obținerea unor membrane poroase cu conținut variabil de nano-hidroxiapatita și 5% metronidazole prin procedeul de electrospinning cu aplicabilitate în regenerarea osoasă ghidată sau boala parodontală.

Materiale și metodă. Pentru acest studiu s-a propus a se obțină trei tipuri de membrane diferite . Mecanismul de obținere a fost descris în studiul II. Biomaterialele au fost suspuse următoarelor investigații: microscopie optică, microscopie electronică de baleaj, citotoxicitate, proprietăți mecanice, bioactivitate. Analiza statistică a fost determinată statistic folosind analiza unică a varianței (ANOVA) și a testul Tukey (versiunea SPSS 11.5, SPSS Inc., SUA). Nivelul de semnificație a fost stabilit la 0,05 și a fost considerat statistic semnificativ.

Rezultate. Imaginiile de microscopie optică ale membranelor obținute, arată diferențe de porozitatea între diferitele concentrații testate. Se poate observa faptul că adăugarea de metronidazol scade porozitatea , iar adăugarea de nano-hidroxiapatita crește porozitatea. Imaginiile de microscopie optică de baleaj au venit în completarea celor de microscopie optică și au scos în evidență o arhitectura tipică de fibre, obținute prin electrospinning, cu o orientare aleatorie, fără conglomerări. Fibrele interconectate alcătuiesc pori cu dimensiuni macro distribuiți în întreaga structură. Dimensiunea fibrelor a variat între 6,5 și 11 μm pentru membranele din policaprolactonă, între 0,6 și 2,5 μm pentru membranele cu 5% metronidazol, iar pentru membranele cu conținut de 5% nano-hidroxiapatită și 5% metronidazol, dimensiunea fibrei a variat între 3 și 11 μm .

Citotoxicitatea membranelor dezvoltate, evaluată la 1 și 3 zile cu ajutorul testului MTT, a arătat ca nici una dintre compoziții nu este toxică. Adăugarea doar de metronidazol a scăzut viabilitatea celulară cu 30% după 1 zi și cu 28% după 3 zile de incubare, în comparație cu lotul martor. Adăugarea ambilor compuși metronidazol și nano-hidroxiapatită a dus la scăderea viabilității celulare la 92,5% la 1 zi și la 90% la 3 zile.

Testele efectuate pentru a evalua proprietățile mecanice ale membranelor dezvoltate au arătat valori situate între 2,2 și 5,2 N pentru rezistența la forța maximă. Rezultatele pentru modulul lui Young au fost înregistrate între 7 și 28 MPa. Cea mai mare valoare a rigidității a fost înregistrată pentru membranelor din policaprolactonă și a fost evaluată la 6,650 N/m, iar cea mai mică valoare obținută a fost 1,990 N/m pentru

membrana cu 5% nano-hidroxiapatită și 5% metronidazol. Rezistența la întindere a fost înregistrată între 1,05 și 2,4 MPa.

Bioactivitatea membranelor cu 5% nano-hidroxiapatită și 5% metronidazol este pusă în evidență prin investigație de microscopie electronică de baleaj după 21 de zile de stocare în fluid similar corpului. Analiza de spectroscopie de raze X prin dispersie de energie a cristalelor observate pe fibre a pus în evidență prezența de calciu, fosfor și clor, astfel confirmând formarea de noi cristale de apatită cu raport calciu/fosfor 1,25.

Concluzii. Biomaterialele dezvoltate experimental au prezentat fibre uniforme, fără conglomerări, care au format macropori în întreaga structură a materialului. Incorporarea metronidazolului a redus dimensiunea fibrelor, iar adăugarea de nano-hidroxiapatită a crescut diametrul acestora. Dimensiunea fibrelor a influențat proprietățile mecanice ale membranelor. Un diametru mai mic al fibrei a redus proprietățile mecanice, iar o dimensiune mai mare le-a mărit. Evaluarea biomineralizării *in vitro* a pus în evidență formarea de hidroxiapatită la suprafața fibrelor membranelor. Sunt necesare teste suplimentare, precum evaluarea proprietăților antibacteriene pentru a dovedi utilitatea lor în tratamentul bolii parodontale și a ingineriei tisulare, precum regenerarea osoasă ghidată.

Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

Studiile cuprinse în teza prezentă fac obiectul unei cercetări originale, cu scopul de a îmbunătăți stadiul actual al cunoașterii referitoare la membranele din generația a III-a. În cadrul acestei cercetării s-a dorit obținerea și caracterizarea diferitelor membrane cu conținut variabil atât de metronidazol, cât și de nano-hidroxiapatită. Acest lucru a dorit să pună în evidență influența precursorilor asupra structurii, proprietăților mecanice și a biocompatibilității. De asemenea s-a dorit obținerea de nano-hidroxiapatită printr-o metodă de precipitarea chimică și punerea în evidență a bioactivității acesteia prin obținerea biomineralizării *in vitro*.

Limitele studiilor realizate în cadrul tezei

Lipsa testelor de citocompatibilitate și proliferare celulară din studiul I reprezintă o limită. De asemenea lipsa testelor de inhibiție bacteriană, eliberarea de antibiotic, degradabilitate, evidențierea funcției de membrană,

testarea proprietăților mecanice în mediul umed sunt limitări ale studiilor II și III.

Direcțiile viitoare de cercetare

Direcțiile de cercetare viitoare vizează continuarea cercetării privind studierea *in vitro* a eliberării de antibiotic, a degradabilității, evidențierea funcției de membrană, testarea proprietăților mecanice în mediul umed. Studii *in vivo* pe model animal, pentru a certifica capacitatea membranelor dezvoltate de a eradica bacteriile anaerobe și de a stimula apozitia osoasă.

Aceste rezultate vor putea duce la fabricarea unor membrane de generația III-a cu conținut optim de metronidazol și nano-hidroxiapatită, care să ofere beneficul maxim pacientului și cele mai puține efecte adverse. De asemenea se dorește ca prețul de producție a acestor membrane să fie cât mai scăzut pentru ca un număr cât mai mare de pacienți să poată beneficia de această soluție terapeutică. În cercetării viitoare se dorește și înglobarea a altor clase de antibiotice în diferite membrane.

Aceste date ar putea îmbunătăți cunoașterea în acest domeniu, și ar putea conduce la obținerea membranelor de generația a III-a, care să poată fi fabricate pe scală largă și care să fie disponibile comercial.

PhD SUMMARY

Development of new porous biomaterials used in guided bone regeneration

PhD Student **Ioana Codruta Mirică**

PhD Supervisor Prof.dr. **Radu Septimiu Câmpian**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CONTENT

INTRODUCTION	13
CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	
1. Guided bone regeneration	17
2. Bone graft	19
3. Properties of the ideal membrane with applicability in guided bone regeneration	23
3.1. Tissue integration	24
3.2. Cellular occlusion	24
3.3. Clinical maneuverability	25
3.4. Space keeper	26
3.5. Biocompatibility	26
4. Membrane generation	27
4.1. First generation	27
4.2. Second generation	29
4.2.1. Natural polymer membranes	30
4.2.2. Synthetic polymer membranes	31
4.3. Third generation	31
4.3.1. Membranes with antimicrobial activity	32
4.3.2. Membranes containing bioactive calcium phosphate	34
4.3.3. Releasing membranes of antimicrobial and ceramic compounds	35
PERSONAL CONTRIBUTION	
1. Working hypothesis / objectives	39
2. Study 1 - Obtaining and characterizing nano-hydroxyapatite	41
2.1. Introduction	41
2.2. Working hypothesis / objectives	42
2.3. Material and method	43
2.4. Results	45
2.5. Discussions	48
2.6. Conclusion	49
3. Study 2 - Structural characterization and mechanical behavior of new membranes obtained with variable nano-hydroxyapatite content and 20% wt. metronidazole	51
3.1. Introduction	51
3.2. Working hypothesis / objectives	53

3.3. Material and method	54
3.4. Results	60
3.5. Discution	71
3.6. Conclusion	73
4. Study 3- Structural characterization and mechanical properties of membranes obtained with nano-hydroxyapatite content and 5% wt. metronidazole	75
5.1. Introduction	75
5.2. Working hypothesis / objectives	77
5.3. Material and method	77
5.4. Results	81
5.5. Discutions	91
5.6. Conclusion	92
6. General discutions	95
7. General conclusions	97
8. Originality and innovative contrubutions of the thesis	99
Refrences	101

Keywords: guided bone regeneration, nano-hydroxyapatite, metronidazole, polycaprolactone, antimicrobial and ceramic release membranes

INTRODUCTION

Guided bone regeneration is based on the principles of guided tissue regeneration, and its ultimate goal is to reconstruct the lost bone volume with the ultimate intention of inserting endosseous implants into a suitable bone volume that completely surrounds the implant surface, the placement of which takes place in an optimal position for the final prosthetic rehabilitation. This surgical technique uses the principle of compartmentalization, ensuring a space delimited by a barrier membrane, which prevents the penetration of neighboring cells, with rapid proliferation and facilitates the development and multiplication of osteoprogenitor cells. The role of a membrane in guided bone regeneration is threefold, and it consists in exerting the function of a physical barrier to keep the bone graft granules in situ during and after the suturing of the overlying soft tissues; prevention of epithelial cell invasion; and the delimitation of a space in which bone regeneration can take place. Currently guided bone regeneration involves the use of different types of membrane (absorbable and non-absorbable) in combination with different bone addition materials. The main cause of guided bone regeneration failure is local infections, despite long-term systemic administration of broad-spectrum antibiotics. The beginning of the new millennium was characterized by the widest development of medical devices in all branches of medicine. Therefore, as the concept of tissue engineering developed, there was a need to reevaluate the membranes used in guided bone regeneration. This is how the third generation membranes began to be described in the literature, which acts not only as barriers, but also as devices for releasing therapeutic or bioactive agents. They can release specific compounds, such as antibiotics, locally at a predefined time to support a natural, superior wound healing and increase the chances of successful bone reconstruction. The need for this study stems from the desire to help both patients and practitioners by providing them with a new, innovative, third-generation membrane at a low cost. Thus, the proposed research aimed at developing a metronidazole-loaded membrane, which facilitates a slow, continuous release of the active substance, thus ensuring a local protection of the postoperative wound, avoiding all the adverse effects of systemic administration. The incorporation of nano-hydroxyapatite inside the membrane fiber will provide bioactivity by stimulating biomineralization, but also the transformation of undifferentiated mesenchymal stem cells into osteoblasts. The process of obtaining, as well as the membrane precursors being very cheap, will lead to obtaining a product, with a low cost, which will replace the use of systemic antibiotic therapy, thus facilitating the access of disadvantaged people to this therapeutic option. The resorbable nature of the membrane brings the advantage of eliminating surgery to remove it, reducing costs, healing time, and avoiding the occurrence of a local infection. Such a membrane is not currently available on the market, it is described only in the literature.

PERSONAL CONTRIBUTION

The aim of this thesis was to develop and characterize new membranes, which would be an alternative to the membranes currently used in guided bone regeneration. Thus, resorbable polycaprolactone membranes with a variable content of nano-hydroxyapatite and metronidazole were obtained by the process of electrospinning. It is well known that the success of guided bone regeneration is influenced by the absence of local infection, but also by the bioactivity of the bone graft used. In this sense, a series of perspectives were pursued:

- (i) obtaining nano-hydroxyapatite by synthesis;
- (ii) structural and chemical characterization of the nano-hydroxyapatite obtained;
- (iii) structural characterization of organic compounds: polycaprolactone, metronidazole;
- (iv) obtaining new membranes with applicability in guided bone regeneration;
- (v) structural characterization of new membranes obtained;
- (vi) evaluation of the mechanical properties of the obtained membranes;
- (vii) cytotoxicity testing;
- (viii) assessment of the bioactivity of nano-hydroxyapatite-containing membranes;

Study 1 - Obtaining and characterizing nano-hydroxyapatite

Introduction. The study was performed in order to synthesize a new type of nano-hydroxyapatite, which can be incorporated into the polymeric matrix of PCL, leading to a new hybrid membrane with biomedical application.

Material and method. Nano-hydroxyapatite was obtained by a wet chemical precipitation method, using calcium and phosphorus precursors. The obtained powder was subjected to X-ray diffraction analysis, X-ray spectroscopy by energy dispersion and transmission electron microscopy to evaluate the crystallinity and particle size. Two syntheses were made.

Results. X-ray diffraction showed an average crystallite size of 35.3 nm. X-ray spectroscopy by energy dispersion confirmed that the powder obtained is hydroxyapatite. Transmission electron microscopy images showed the production of acicular nano-hydroxyapatite particles, which had an average size of 33.74 nm (± 9.56 SD) in synthesis I, respectively with values of 31.49 nm (± 9.75 SD) (Fig. 6) in synthesis II.

Conclusions. Nano-hydroxyapatite with biomedical application has been obtained.

Study 2 - Structural characterization and mechanical behavior of new membranes obtained with variable nano-hydroxyapatite content and 20% wt. metronidazole

Introduction. In this study, it was desired to obtain generation III membranes with variable nano-hydroxyapatite content and 20% metronidazole by the electrospinning process with applicability in guided bone regeneration.

Materials and method. Four different types of membranes were proposed in this study, using polycaprolactone, metronidazole, nano-hydroxyapatite (synthesized in study I), dichloromethane and dimethylformamide as precursors. An experimentally constructed electrospinning machine was used. The obtained membranes were subjected to the following investigations: Infrared spectroscopy with attenuated total reflectance, optical microscopy, scanning electron microscopy, cytotoxicity, mechanical properties. The statistical analysis was performed using the unique analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test with the significance level set at 0.05.

Results. Infrared spectroscopy with attenuated total reflectance did not indicate the formation of a new crystalline phase or the new changes in the crystalline phases were too small to create a high signal. Optical microscopy images showed different porosity depending on the composition. Scanning microscopy images showed randomly oriented fibers without conglomerates, building a porous structure with interconnected macropores. None of the compositions showed cytotoxicity, and the mechanical properties of the membranes obtained experimentally were similar to those commercial, as described in the literature.

Conclusions. The new experimental membranes could be promising materials for guided bone regeneration or other tissue engineering applications. These results encourage us to continue *in vitro* and *in vivo* investigations for their clinical application.

Study 3- Structural characterization and mechanical properties of membranes obtained with nano-hydroxyapatite content and 5% wt. metronidazole

Introduction. In this study, it was desired to obtain porous membranes with variable content of nano-hydroxyapatite and 5% metronidazole by the electrospinning process with applicability in guided bone regeneration or periodontal disease.

Materials and method. In this study it was proposed to obtain three different types of membranes. The obtaining mechanism was described in study II. The biomaterials were subjected to the following investigations: optical microscopy, scanning electron microscopy, cytotoxicity, mechanical properties, bioactivity. Statistical analysis was statistically determined using single variance analysis (ANOVA) and the Tukey test (SPSS version 11.5, SPSS Inc., USA). The significance level was set at 0.05 and was considered statistically significant.

Results. The optical microscopy images of the obtained membranes show differences in porosity between the different concentrations tested. It can be seen that the addition of metronidazole decreases the porosity, and the addition of nano-hydroxyapatite increases the porosity. The scanning optical microscopy images complemented the scanning optical microscopy images and highlighted typical fiber architecture for electrospinning, with a random orientation, without conglomerations. The interconnected fibers form pores with macro dimensions distributed throughout the structure. The fiber size varied between 6.5 and 11 μm for polycaprolactone membranes, between 0.6 and 2.5 μm for membranes with 5% metronidazole, and for membranes containing 5% nano-hydroxyapatite and 5% metronidazole, the fiber size varied between 3 and 11 μm .

The cytotoxicity of the developed membranes, assessed at 1 and 3 days using the MTT test, showed that none of the compositions were toxic. The addition of metronidazole alone decreased cell viability by 30% after 1 day and by 28% after 3 days of incubation compared to the control group. The addition of both metronidazole and nano-hydroxyapatite resulted in a decrease in cell viability to 92.5% in 1 day and 90% in 3 days.

Tests performed to evaluate the mechanical properties of the developed membranes showed values between 2.2 and 5.2 N for maximum strength. The results for Young's module were recorded between 7 and 28 MPa. The highest stiffness value was recorded for polycaprolactone biomaterials and was assessed at 6,650 N / m, and the lowest value was 1,990 N / m for polycaprolactone membrane 5% nano-hydroxyapatite and 5% metronidazole. The tensile strength was recorded between 1.05 and 2.4 MPa.

The bioactivity of polycaprolactone membranes with 5% nano-hydroxyapatite and 5% metronidazole is highlighted by scanning electron microscopy investigation after 21 days of storage in body-like fluid. X-ray spectroscopy analysis by energy dispersion of the crystals observed on the fibers revealed the presence of calcium, phosphorus and chlorine, thus confirming the formation of new apatite crystals with calcium / phosphorus ratio 1.25.

Conclusions. The experimentally developed membranes showed uniform fibers, without conglomerations, which formed macropores in the entire structure of the material. The incorporation of metronidazole reduced the size of the fibers, and the addition of nano-hydroxyapatite increased their diameter. The size of the fibers influenced the mechanical properties of the membranes. A smaller fiber diameter reduced the mechanical properties, and a larger size increased them. Evaluation of *in vitro* biomineralization revealed the formation of hydroxyapatite on the surface of membrane fibers. Additional tests, such as the evaluation of antibacterial properties, are needed to prove their usefulness in the treatment of periodontal disease and tissue engineering, such as GBR.

Originality and innovative contributions of the thesis

The studies included in this thesis are the subject of an original research, in order to improve the current state of knowledge regarding the membranes of the third generation. The aim of this research was to obtain and characterize different membranes with variable content of both metronidazole and nano-hydroxyapatite. This was intended to highlight the influence of precursors on structure, mechanical properties and biocompatibility. It was also desired to obtain nano-hydroxyapatite by a chemical precipitation method and to highlight its bioactivity by obtaining in vitro biomineralization.

The limits of the studies carried out within the thesis

The lack of cytocompatibility and cell proliferation tests in study 1 is a limitation. Also, the lack of bacterial inhibition tests, the release of antibiotics, degradability, the highlighting of the membrane function, the testing of the mechanical properties in the humid environment are limitations of studies 2 and 3.

Future research directions

Future research directions aim to continue the research on the in vitro study of antibiotic release, degradability, highlighting the membrane function, testing the mechanical properties in the humid environment. *In vivo* animal studies to certify the ability of developed membranes to eradicate anaerobic bacteria and stimulate bone apposition.

These results may lead to the manufacture of third-generation membranes with optimal metronidazole and nano-hydroxyapatite content, which will provide maximum benefit to the patient and the least adverse effects. It is also hoped that the production cost of these membranes will be as low as possible so that as many patients as possible can benefit from this therapeutic solution. Future research also seeks to incorporate other classes of antibiotics into different membranes. This data could improve knowledge in this field, and could lead to the production of third-generation membranes that can be manufactured on a large scale and that are commercially available.