



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2022 00385**

(22) Data de depozit: **05/07/2022**

(41) Data publicării cererii:
30/01/2024 BOPI nr. 1/2024

(71) Solicitant:
• UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "IULIU HAȚIEGANU" CLUJ-NAPOCA, STR. VICTOR BABEȘ NR. 8, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• UNIVERSITATEA "BABEȘ-BOLYAI" DIN CLUJ-NAPOCA, STR. MIHAIL KOGĂLNICEANU NR. 1, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU OPTOELECTRONICĂ INOE2000, FILIALA INSTITUTUL DE CERCETĂRI, PENTRU INSTRUMENTAȚIE ANALITICĂ CLUJ-NAPOCA STR. DONATH, NR. 67, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

(72) Inventatori:
• ILEA ARANKA, STR. MĂRĂȘEȘTI, NR. 45, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• DINTE ELENA, STR. LUCEAFĂRULUI NR. 7, AP. 20, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• BOȘCA ADINA BIANCA, STR. VIDRARU NR. 5-7, AP. 83, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• BARABAS REKA, STR. BUCUREȘTI NR. 51, SC. 2, ET. 2, AP. 34, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• BIZO LILIANA-ANTONELA, STR. PLOPIILOR, NR. 60, AP. 14, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• CADAR OANA - ALINA, STR. OAȘULUI, NR. 340M, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

(54) **MATRICE CU EFECT ANTIMICROBIAN LOCAL ȘI IMUNOMODULATOR GENERAL PE BAZĂ DE DOXICICLINĂ ÎNCAPSULATĂ ÎN NANOFIBRE DE ACID POLILACTIC ȘI HIDROXIAPATITĂ**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui sistem matriceal compozit utilizat pentru tratamentul multimodal al bolii paradontale. Procedeu, conform invenției, constă în etapele: preparare hidroxiapatită (HAP) prin metoda coprecipitării, adsorbția doxicilinei (Doxy) pe HAP rezultând o fază solidă și o fază lichidă, prepararea soluției de 5% acid polilactic (PLA), adăugarea fazei solide la soluția de PLA cu agitare la tem-

peratura ambiantă timp de 24 h, aplicarea tehnicii de electrospinning rezultând un sistem matriceal pe bază de nanofibre de acid polilactic (5%) și hidroxiapatităcu Doxiciclină încapsulată (0,7%), de tip PLA/HAP/Doxy cu efect antimicrobian local și imunomodulator general.

Revendicări: 6
Figuri: 17

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art. 32 din Legea nr. 64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art. 23 alin. (1) - (3).



Matrice cu efect antimicrobian local și imunomodulator general pe bază de Doxiciclină încapsulată în nanofibre de acid polilactic și hidroxiapatită

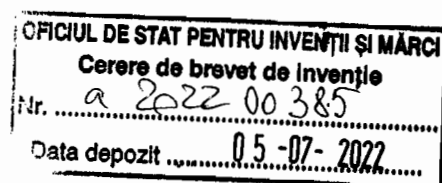
Prezenta invenție se referă la o matrice cu efect antimicrobian local și imunomodulator general pe bază de Doxiciclină încapsulată în nanofibre de acid polilactic și hidroxiapatită. Sistemul matriceal pe bază de acid polilactic (PLA 5%) și nano-hidroxiapatită (HAP), cu doparea nanofibrelor cu Doxiciclină (0,7%) are rol în eliberarea locală controlată a antibioticului, astfel având efect un antibacterian local, cu rol în controlul infecției locale și reducerea proceselor de metainflamație, dar și intervenind în modularea răspunsului inflamator general, asigurând astfel un tratament multimodal al bolii parodontale. Invenția se încadrează în domeniul medical.

Contextul general

Boala parodontală reprezintă o problemă globală de sănătate publică, datorită răspândirii la mai mult de 50% din populația adultă și a alterării calității vieții prin efectele distructive asupra aparatului dento-maxilar și creșterea riscului de apariție a multiple afecțiuni sistemice. Boala parodontală este o inflamație cronică polimicrobiană inițiată de bacteriile parodontopatogene de la nivelul biofilmului subgingival și favorizată de diverși factori: vârsta pacienților, fumatul, stresul, factorii genetici etc. Mai mult, în cadrul inflamației cronice induse de patogenii parodontali, este activat răspunsul imun al gazdei. Acesta, împreună cu factorii microbieni, au o contribuție esențială în evoluția bolii, care conduce la distrucția ireversibilă a țesuturilor parodontale și, în final, la pierderea unităților dentare. De asemenea, boala parodontală este asociată cu diverse afecțiuni generale, care au ca numitor comun metainflamația sistemică: bolile cardiovasculare, afecțiunile renale cronice, sindromul metabolic, etc. [Papapanou, 2018].

Tratamentul bolii parodontale presupune: (a) *controlul inflamației* prin îndepărtarea biofilmului bacterian și (b) *stimularea regenerării* pentru *restituirea funcțională* a țesuturilor parodontale [Newman, 2018]. Controlul inflamației se realizează în cadrul terapiei inițiale, prin detartraj și planarea radiculară pentru îndepărtarea mecanică a tartrului, plăcii bacteriene și a biofilmului subgingival, urmată de chiuretarea țesuturilor afectate de inflamație. Deși terapia inițială este considerată tratamentul non-chirurgical ideal, în anumite condiții, cum ar fi: pungile parodontale adânci, anfractuozitate și afectarea furcației radiculare, rezultatele detartrajului și planării radiculare ca singură abordare terapeutică s-au dovedit a fi imprevizibile și inconstante. În aceste cazuri, este necesară instituirea tratamentului adjuvant, prin aplicarea topică a unor substanțe cu efect antimicrobian și anti-inflamator [Graziani, 2000]. Asocierea agenților antimicrobieni la tratamentul non-chirurgical optimizează rezultatul terapeutic și previne re-colonizarea bacteriană a situsurilor inaccesibile tratamentului mecanic [Singh, 2021].

Realizarea regenerării țesuturilor afectate reprezintă un deziderat al parodontologiei moderne. Regenerarea tisulară ghidată se bazează pe utilizarea membranelor care, plasate peste defectele parodontale, realizează o barieră fizică între osul de care sunt atașate ligamentele parodontale (care au o rată de regenerare mai redusă) și gingia cu țesutul conjunctiv (cu o rată de regenerare mai înaltă și care prin multiplicarea celulară rapidă ar invada spațiile respective) [Newman, 2018]. În practica clinică au fost introduse diverse tipuri



de membrane neresorbabile și resorbabile, urmate de membranele transportoare de diferite substanțe: antibiotice, antiseptice, factori de creștere sau factori de adeziune [Madhuri, 2016].

Stadiul tehnicii

Primele generații de membrane și-au propus realizarea barierei împotriva proliferării tisulare epiteliale, utilizând materiale neresorbabile. În ciuda eficacității lor dovedite de-a lungul timpului, aceste membrane prezintă o serie de dezavantaje. În primul rând, caracterul lor non-resorbabil implică necesitatea unui al doilea timp operator, pentru a fi îndepărtate. Aceasta se poate traduce în disconfortul pacientului, precum și posibilitatea apariției unor complicații postoperatorii [Madhuri, 2016; Singh, 2013]. Mai mult decât atât, riscul apariției de dehiscențe și expunerea lor în cavitatea orală face ca utilizarea acestor membrane să nu fie ideală [Madhuri, 2016].

Datorită acestor dezavantaje, **a doua generație de membrane** a fost dezvoltată [Sam, 2014]. Acestea au marele avantaj de a fi resorbabile, ceea ce reduce disconfortul creat pacientului prin eliminarea celui de-al doilea timp operator, precum și reducerea riscului de complicații cauzate de acesta [Singh, 2013].

Membranele resorbabile sunt împărțite în două mari categorii: (i) membrane naturale – realizate cel mai frecvent din colagen; acestea sunt xenogrefe obținute de la specii bovine sau porcine (exemplu: pericard porcine - Jason[®], Botiss, Germania) și (ii) membrane sintetice – pot fi realizate din acid poliglicolic, acid polilactic, policaprolactonă, etc. [Sam, 2014].

Matrici din polimeri naturali sunt des utilizate datorită biocompatibilității lor [Almany, 2005]. Colagenul, de exemplu, se folosește des ca și matrice deoarece este un component major al matricei extracelulare. În plus, încorporarea colagenului cu alți componenți biologici cum ar fi alginatul, acidul hialuronic [Yoo, 2005] sau amidonul [Pavlov, 2004] în polimeri sintetici poate îmbunătăți citocompatibilitatea matricii. Astfel s-au investigat aplicațiile biomedicale ale unor substanțe biologice cum ar fi colagenul, fibrinogenul și chitosanul. În comparație cu polimerii sintetici, electrospinningul materialelor biologice este mai puțin versatilă, deoarece trebuie folosit un solvent care să nu compromită integritatea acestora [Zhang, 2005]. Elastinul și fibrinogenul sunt alte proteine care se găsesc în corpul uman și s-au folosit în fibre de electrospinning. Elastinul este o componentă majoră a arterelor și a plămânilor, oferindu-le elasticitate [Berghlund, 2004]. Fang și Reneker au reușit chiar și electrospinning-ul de ADN [Wand, 2016]. Alte molecule naturale care s-au folosit în procese de electrospinning includ chitosanul, dextranul sau mătasea. Fibrele de mătase au biocompatibilitate și biodegradabilitate mare, și prezintă răspuns inflamator minim când sunt implantate *in vivo* [Jin, 2002]. Au fost de asemenea investigate preparatele de chitosan și dextran, aceste materiale având proprietăți materiale și funcționale care ar putea fi folosite în ingineria tisulară [Duan, 2004].

Matrici din polimer sintetic. Fibrele de PLGA (acidul poli-lacto-co-glicolic) obținute prin electrospinning au o porozitate de peste 90%. Astfel, acest material este ideal pentru matricile folosite în ingineria tisulară deoarece suprafața mare permite atașarea unui procent mare de celule [Geng, 2005]. Versatilitatea tehnicii de electrospinning a permis obținerea unui set divers de materiale biologice și sintetice [Subbiah, 2005], iar modificările funcționale ale nanofibrelor îmbunătățesc biocompatibilitatea și citocompatibilitatea polimerului.

Policaprolactamul și polilactidul sunt deasemenea polimeri biocompatibili și biodegradabili care se pot folosi cu succes în procese de electrospinning.

Dezavantajul membranelor resorbabile este reprezentat de viteza variabilă de resorbție în organism, ceea ce nu permite controlul duratei de acțiune a acestora în organism [Sam, 2014; Singh, 2013]. De asemenea, datorită naturii resorbabile a membranelor, acest fenomen poate produce alterări ale țesuturilor adiacente, fie prin natura inflamatorie a procesului de resorbție, fie prin produșii de degradare obținuți în urma acestuia [Singh, 2013]. Datorită acestor dezavantaje, membranele sintetice din cea de-a doua generație nu au fost folosite extensiv în practica medicală, produsele de origine animală fiind preferate în terapia de regenerare.

Pe de altă parte însă, odată cu dezvoltarea procedurilor de producție a membranelor sintetice, concomitentă cu deslușirea fiziologiei și proceselor apărute în timpul regenerării, au permis dezvoltarea membranelor aparținând **celeii de-a treia generații**: membranele transportoare de diferite substanțe [Sam, 2014]. **Matrici funcționalizate**. O strategie comună în ingineria tisulară reprezintă funcționalizarea matricii pentru a mări biocompatibilitatea acestuia. Astfel polietilen glicolul [Benz, 1998], chitosanul [Kim, 2006], heparina [Casper, 2005] s-au folosit cu succes pentru modularea matricilor obținute prin electrospinning. Se pot crea, de asemenea, **matrici compozite** folosind tehnica electrospinning. De exemplu, prin electrospinningul secvențial al diferitor soluții de polimeri, se poate obține o matrice cu mai multe straturi. Fiecare strat poate fi modificat pentru adeziune celulară specifică [Kidoaki, 2005]. De asemenea electrospinningul se poate realiza folosind amestecuri de polimeri, obținându-se matrici cu diferite tipuri de fibre [Matthews, 2002].

Produsele aparținând **celeii de-a treia generații** sunt reprezentate de membrane pe suprafața cărora au fost adăugate substanțe antibiotice, antiseptice, factori de creștere sau factori de adeziune, din dorința de a le spori eficacitatea. Astfel, sistemele obținute nu își exercită doar rolurile primare în tehnica regenerării, de conformare și protecție a zonei regenerate, ci și un rol secundar de eliberare a factorilor adăugați, cu scopul de îmbunătățire a șanselor de reușită și a țesuturilor obținute prin terapia de regenerare [Sam, 2014].

Membranele îmbunătățite cu substanțe antimicrobiene au fost dezvoltate datorită complicațiilor frecvente apărute prin contaminarea bacteriană a situsurilor regenerate. Populația bacteriană, numărul de bacterii prezente și suprafața de membrană colonizată de acestea, reprezintă factori majori ai eșecului terapiei de regenerare parodontală. Prezența coloniilor bacteriene a fost asociată cu o creștere a riscului de retracții gingivale și corelată negativ cu cantitatea de țesuturi formate în urma tratamentului [Sam, 2014]. Literatura atestă creșterea cantității de țesuturi regenerate la pacienții cu boală parodontală (în remisie sau în antecedente), prin utilizarea de Amoxicilină și Tetraciline în membranele folosite pentru regenerarea defectelor parodontale [Hung, 2005].

Eficacitatea crescută obținută prin adăugarea de substanțe antibiotice poate fi explicată nu doar prin reducerea încărcăturii microbiene, ci și prin efectele non-antimicrobiene dezvoltate de acestea. Astfel, s-a observat că aceste substanțe au și un efect anticlagenolitic asupra țesuturilor adiacente, inhibând activitatea osteoclastelor și stimulând activitatea fibroblaștilor [Sam, 2014].

Un alt sistem de matrici aparținând celeii de-a treia generații a fost dezvoltat prin adăugarea de fosfat de calciu bioactiv pe suprafața acestora. Un astfel de sistem, obținut din

88

acid polilactic prin tehnici de electrospinning îmbunătățit cu hidroxiapatită, a demonstrat creșterea biocompatibilității prin adăugarea de fosfat de calciu, precum și creșterea proprietăților osteoinductive [Liao, 2005].

Factorii de creștere tisulari, cunoscuți și sub numele de morfogeni, reprezintă un alt domeniu de interes al ultimilor ani în cercetarea fundamentală. Aceștia au rolul de a modula activitatea celulară și de a stimula diferite specii celulare pentru diferențierea și ghidarea proceselor de regenerare tisulară. Aplicații locale, factorii de creștere pot influența angiogeneza, chemotactismul și proliferarea celulară, precum și producerea sau degradarea matricilor proteice extracelulare [Sam, 2014].

Marele dezavantaj al utilizării acestor factori de creștere în activitatea clinică curentă este reprezentat de către larga paletă de morfogeni care intervin în procesele de regenerare tisulară. Astfel, încorporarea factorilor la nivelul membranei trebuie realizată în număr cât mai mare, iar paleta acestora trebuie să includă o varietate largă de morfogeni, pentru obținerea unei regenerări complete a țesuturilor afectate. De asemenea, dinamica eliberării factorilor de creștere la nivelul situsului regenerat este foarte importantă. Acest proces trebuie să mimeze necesitățile țesuturilor în diversele faze de regenerare, eliberarea lor fiind realizată diferit cronologic [Sam, 2014].

În literatura de specialitate sunt descrise numeroase tehnici pentru fabricarea nanomaterialelor, ca de exemplu: sinteza template [Zaikov, 2016], solvent casting-ul [Mehrabanian, 2001], separarea de faze [Yabu, 2019] și **tehnica de electrospinning** [Haider, 2018]. Dintre acestea, tehnica de electrospinning a primit o atenție deosebită deoarece nanofibrele obținute se dispun într-un raport suprafață/volum mare și prezintă un număr ridicat de pori inter/intra fibroși [Braghirolli, 2014]. **Tehnica de electrospinning** este o metodă modernă care folosește forța electrostatică pentru producerea fibrelor fine din soluții de polimeri, aceste fibre având un diametru mai mic (de la ordinul nanometrilor până la ordinul micrometrilor) și o suprafață mai mare decât cele obținute prin metode convenționale de spinning. Un sistem de electrospinning constă din trei componente majore, și anume: o alimentare electrică de înaltă tensiune, o duză de filare și un colector, și utilizează o sursă de tensiune pentru a injecta încărcare electrică de o anumită polaritate într-o soluție de polimer, care apoi se trimite spre colectorul de polaritate opusă [Bhardwaj, 2010].

Morfologia și diametrul fibrelor obținute prin electrospinning depind de o serie de parametri: parametri de soluție (conformația, momentul dipol, constanta dielectrică, cristalinitatea, masa moleculară a polimerului, presiunea de vapori, polaritatea și tensiunea de suprafață a solventului, respectiv vâscozitatea, concentrația, elasticitatea și conductivitatea electrică a soluției), variabile controlabile (debitul de alimentare, câmpul electric aplicat, distanța dintre vârful seringii și colector, diametrul seringii, compoziția colectorului) și parametri ambientali (temperatura, umiditatea și viteza aerului) [Lu, 2008].

Electrospinning-ul oferă o tehnică simplă și rentabilă pentru producerea matricelor. Până în prezent peste 100 de polimeri de origine naturală sau sintetică s-au folosit pentru obținerea de nanofibre cu aplicații în numeroase domenii [Haider, 2018]. Aceste domenii s-au extins rapid în ultimii ani, cele mai importante se pot clasifica în aplicații biomedicale, materiale și dispozitive funcționale, respectiv energie și electronică. Fibrele obținute prin tehnica de electrospinning reprezintă un suport promițător în ingineria tisulară, oferind celulelor un mediu care imită matricea extracelulară nativă.

Un aspect important al ingineriei tisulare îl reprezintă crearea unor suporturi/matrici (cu proprietăți mecanice și biologice specifice) similare cu proprietățile matricei extracelulare native. *In vivo*, marea majoritate a celulelor sunt în contact cu matricea extracelulară nativă, care este compusă dintr-o rețea de proteine și glicosoaminoglicani [Xu, 2004]. Interacțiunile dintre celule și matricea extracelulară nativă pot modula activități celulare cum ar fi migrația, diferențierea, expresia genică, sau secreția diferiților hormoni. Astfel, cu cât seamănă mai mult mediul *in vivo* cu această matrice (compoziție chimică, morfologie, grupări funcționale de pe suprafață), cu atât crește succesul implantării matricii prin tehnici de inginerie tisulară [Xu, 2004].

Matricea în ingineria tisulară funcționează ca suport extracelular nativ temporar, până la apariția regenerării sau vindecării. Această matrice oferă celulelor un cadru tridimensional pe care acestea se pot atașa și dezvolta *in vitro* [Sharma, 2004]. Astfel celula/matricea construită se poate implanta la locul defect pentru a facilita regenerarea tisulară. Există câteva caracteristici pe care o matrice trebuie să le îndeplinească pentru a putea fi folosit în ingineria tisulară. Astfel, matricea trebuie să fie biocompatibilă pentru a se integra în țesutul gazdă, fără a declanșa un răspuns imun major [Dalton, 2008]. De asemenea, matricea trebuie să fie poroasă și să posede o suprafață mare pentru a permite atașarea celulelor și creșterea țesutului [Sharma, 2004]. Deoarece matricea reprezintă un suport temporar pentru aderarea celulelor, trebuie să semene cu matricea extracelulară atât arhitectural cât și funcțional. Matricea trebuie să fie și biodegradabilă, astfel încât să nu fie necesară o a doua intervenție pentru eliminarea implantului [Rosso, 2005].

Agenții antimicrobieni administrați local au avantajul de a atinge concentrații crescute la nivelul țesuturilor parodontale (de până la 100 de ori mai mari față de administrarea sistemică). La administrarea per os a **Doxiciclinei** trebuie să fie luate în considerare anumite contraindicații care țin de patologia generală a pacientului, precum și de efectele adverse ale antibioticului, cum ar fi modificarea microflorei intestinale, sau riscul de a dezvolta tulpini microbiene rezistente la antibiotic [Budai, 2020]. Mai mult, prin administrarea generală, concentrația de Doxiciclină la nivelul țesuturilor parodontale este redusă, și nu se obține o doză locală eficientă din punct de vedere terapeutic. Un alt avantaj al administrării locale constă în eficiența rezultată în urma unei singure aplicări, în timp ce pentru administrarea pe cale generală sunt necesare doze multiple, repetate la anumite intervale de timp. Totodată complianța pacienților și respectarea posologiei este un factor important, care nu poate fi controlat de către medic, dar poate fi optimizat prin aplicarea topică a substanțelor terapeutice în cadrul planului de tratament. În plus, prin administrarea locală rezultă o concentrație plasmatică redusă și astfel sunt evitate efectele adverse la nivel sistemic, fiind demonstrată siguranța clinică. Aceste avantaje au încurajat medicii stomatologi să introducă în practica clinică diverse sisteme pentru administrarea locală a agenților antimicrobieni în pungile parodontale: fibre, membrane, geluri injectabile, sisteme micro- și nanoparticulate și sisteme veziculare [Singh, 2021; Budai, 2020].

Tehnica de electrospinning este accesibilă, cost-eficientă și facilă în vederea obținerii de matrici nanofibroase pentru ingineria tisulară, sistemele de administrare a substanțelor terapeutice și realizarea pansamentelor pentru răni [Budai, 2020]. Astfel, sistemele nanofibroase de administrare a medicamentelor se pot îngloba în cadrul matricilor pentru a preveni infectarea pe parcursul procesului de vindecare și regenerare [Pham, 2006].

85

Avantajele acestor sisteme sunt numeroase: (i) raportul mare de suprafață-volum al matricelor obținute prin electrospinning permit o încărcare mare (până la 60%) și transportul eficient al unui medicament; (ii) pot fi folosiți diferiți polimeri, în funcție de compatibilitatea ingredientelor farmacologice active; (iii) procesul este facil și accesibil; (iv) este posibilă modularea eliberării ingredientelor active.

Sistemele de eliberare locală a medicamentelor sunt clasificate în trei categorii: nesuținute, susținute și controlate. Sistemele de administrare nesuținută asigură o eliberare imediată a agenților terapeutici prin intermediul irigației subgingivale. Sistemele cu eliberare susținută presupun atingerea unei concentrații mari a substanței medicamentoase în punga parodontală, dar pe o perioadă scurtă, de până la 24h. În schimb, sistemele cu eliberare controlată pot să rețină agenții terapeutici în punga parodontală pe o perioadă extinsă (mai mult de 24 de ore) [Tan, 2019].

Pentru eliberarea controlată a substanței medicamentoase, pot fi folosiți atât polimeri non-biodegradabili, cât și biodegradabili, cum ar fi: acidul polilactic (PLA), acidul poliglicolic, acidul poli-lacto-co-glicolic (PLGA) și policaprolactona (PCL). Acidul polilactic (PLA) are o structură moleculară regulată și poate cristaliza în anumite condiții. Solubilitatea substanței medicamentoase în polimer și în mediul adiacent matricii sunt dependente de structura componentelor și distribuția acestora. Astfel, unele medicamente pot fi dizolvate, iar altele precipită și se prezintă ca și cristale printre fibre. Structura determină eliberarea medicamentului și permite controlul concentrației tisulare pentru obținerea efectului terapeutic [Budai, 2020].

Sisteme de administrare a medicamentelor. Antibiotice testate și puse pe piață (studiu de literatură)

Biomaterialele polimerice sunt avantajoase deoarece pot fi controlate pentru transportul eficient al agenților terapeutici la locuri bine definite [Gombotz, 1995].

Se cunosc următoarele: Atridox® (Laboratoarele Atrix, Inc. Fort Collins, Colorado, SUA) conține 10% Doxiciclină hyclat și o mixtură de PLA (acid polilactic) și N-metil-2-pirolidonă sub formă de gel fluid bioabsorbabil, destinat aplicării în pungile parodontale [Singh, 2021], iar Ligoslo (Heraeus Kulzer GmbH Grüner Weg 11 63450 Hanau, Germany) conține Doxycycline hyclate 140 mg/g de gel parodontal (Slow Release Periodontal Gel). Elyzol® (Laboratoarele Dumex, Copenhaga, Danemarca) este un gel care conține 25% metronidazol benzoat într-o mixtură de gliceril mono-oleat și ulei de susan, care este degradat lent de enzimele din lichidul crevicular. Preparatele pe bază de minociclină sunt: (i) Arestin® (Laboratoarele OralPharma, Inc., Warminster, Pennsylvania, SUA) care conține 1 mg de minociclină hidroclohid sub formă de microsferă bioresorbabile într-o bază de poli-glicolid-lactidă, un polimer care este inițial sub formă de pulbere și hidrolizează imediat în contact cu lichidul crevicular, aderând de pereții pungii parodontale; (ii) Dentomycin® (Laboratoarele Lederle Dental Division, Gosport, Hampshire, Marea Britanie) și (iii) Periocline® (Laboratoarele Sunstar Corp., Tokyo, Japonia) conțin 2% Minociclină hidroclohid într-o matrice de hidroxietil celuloză, aminoalchil metacrilat, triacentină și glicerină, sub formă de unguent biodegradabil. Periodontal Plus AB™ (Laboratoarele Advanced Biotech Products, Chennai, India) este un preparat pe bază de fibrile de colagen tip I care conține 2 mg de tetraciclină hidroclohid la 25 de mg de fibrile de colagen [Tan, 2019].

Sistemele nanofibroase de administrare a medicamentelor se pot combina cu matrici pentru a preveni infectarea, în timp ce apare procesul de vindecare și regenerare [Pham, 2006]. Raportul mare de suprafață-volum al matricilor obținute prin electrospinning permit transportul eficient al unui medicament. S-au introdus cu succes mai multe medicamente în astfel de matrici [Varreck, 2003; Ma, 2005]. O metodă de a încorpora medicamentul în nanofibre implică solubilizarea medicamentului în soluția de polimer care urmează să fie supusă procesului de electrospinning [Kenawy, 2002]. Conjugarea covalentă pe polimeri reprezintă o altă metodă folosită pentru eliberarea medicamentului.

Hidroxiapatita (Hap) este componentul mineral principal al oaselor [Liu, 2019]. Datorită proprietăților unice, cum ar fi *biocompatibilitate*, *bioactivitate*, *osteoconductivitate* și *afinitate față de biopolimeri* [Barabas, 2020] acest material are aplicații în biomedicină [Mondal, 2016], dispozitive medicale [Cho, 2014] sau în sisteme de administrare a medicamentelor [Yang, 2008]. Pe de altă parte, Hap are și o altă proprietate, cea antibacteriană, aspect augmentat prin doparea cu ioni metalici (ioni de argint (Ag^+), zinc (Zn^{2+}), magneziu (Mg^{2+}) și cupru (Cu^{2+})) [Simulingga, 2021]. Fabricarea materialelor compozite pe bază de Hap, cu proprietăți antibacteriene ar putea fi o soluție pentru a reduce eșecurile în practica medicală. Compozitele cu nanoparticule ar putea inhiba creșterea bacteriilor și fungilor. Încorporarea de Hap/hidrogel și antibiotice este, de asemenea, utilizată pentru inhibarea creșterii bacteriene [Lamkhao, 2019].

Acidul polilactic (PLA) este un poliester versatil, biodegradabil, obținut din resurse regenerabile. Acest material se utilizează în industria ambalajelor sau a dispozitivelor medicale biocompatibile/ bioabsorbabile [Garlotta, 2001]. Este cel mai des utilizat poliester alifatic în ingineria tisulară și în sisteme de administrare a medicamentelor datorită biodegradabilității și biocompatibilității excelente [Huang, 2018].

Doxiciclina este cel mai comun antibiotic cu spectru larg din familia tetraciclinelor. Doxiciclina este un derivat semisintetic de a doua generație a tetraciclinei care prezintă activitate antimicrobiană superioară, inclusiv împotriva tulpinilor de bacterii rezistente la Tetraciclină, datorită proprietăților optimizate de absorbție și duratei prelungite de acțiune [Tan, 2019]. Prin spectrul larg de acțiune, Doxiciclina este eficientă împotriva a numeroase bacterii gram pozitive și gram negative, aerobe și anaerobe, precum și împotriva speciilor: Mycoplasma, Chlamydia, Rickettsia, inclusiv unele protozoare și mycobacterii [Eskitoros, 2019]. În parodontita cronică, prezintă un efect antimicrobian asupra patogenilor parodontali anaerobi, inhibă sinteza de proteine prin legarea de ARN-ul mesager ribozomal 30S și determină liza membranei celulare. La nivelul țesuturilor parodontale, Doxiciclina prezintă numeroase efecte de modulare a răspunsului imuno-inflamator al organismului gazdei: (i) are proprietăți antiinflamatoare prin inhibarea activității citokinelor: factorul de necroză tumoral α (TNF- α), interleukinele-1 β și 6 (IL-1 β , IL-6); (ii) limitează distrucțiile tisulare prin supresia enzimelor proteolitice endogene: metaloproteinazele matriciale (MMPs) și a hidrolazelor (α -amilaza); (iii) prezintă activitate antioxidantă prin eliminarea speciilor reactive ale oxigenului [Madi, 2018]. Aceste efecte sunt independente de activitatea antibacteriană, iar Doxiciclina este eficientă la doze mai mici decât cele utilizate în mod curent pentru tratamentul antimicrobian.

Sistemele cu eliberare locală controlată asigură, pe de o parte, eliberarea precisă a Doxiciclina la nivelul situsului inflamator și pe de altă parte, o remanență prelungită, întrucât

matricile, odată ce au fost introduse în pungile parodontale, nu pot fi mobilizate prin mecanismele locale de autocurățire sau curățire artificială, spre deosebire de soluțiile sau gelurile aplicate pe suprafața gingiei sau în sulcus. În vederea obținerii de sisteme cu eliberare locală controlată, încorporarea Doxiciclinei în matrici din biomateriale polimerice prin electrospinning s-a realizat cu succes [Khalf, 2017; Dadras, 2018; Eskitoros, 2019]. Prin remanența prelungită, matricile au avantajul de a asigura doza optimă de Doxiciclină pentru exercitarea efectelor terapeutice. Studiile au demonstrat că, după aplicare, concentrația locală a agentului antimicrobian depășește concentrația inhibitorie minimă (MIC) și se menține la niveluri crescute timp de 7 până la 14 zile [Ahamed, 2013].

La nivel național și internațional, dintre brevetele de invenție având ca subiect **tehnica de electrospinning**, nici unul dintre acestea nu tratează obținerea unei matrici pe bază de Doxiciclină încapsulată în nanofibre de acid polilactic și hidroxiapatită. Din cunoștințele noastre, există puține brevete de invenție care tratează subiecte similare cu cele ale prezentei invenții.

Astfel, **brevetul de invenție RO127534 “Procedeu de obținere a structurilor de susținere celulară și materiale compozite destinate ingineriei țesuturilor”** face referire la un procedeu de obținere a unui material compozit doar pe bază de polimeri, acid polilactic și polidioxanonă, pentru realizarea unor structuri de susținere celulară. Brevetul de invenție RO127534 se referă doar la dezvoltarea unui sistem matriceal compozit (având în compoziție și acid polilactic) care să aibă rol conductiv pentru structurile celulare, fără să se fi adăugat în compoziție niciun antibiotic.

Brevetul de invenție RO128972 “Membrană de colagen cu doxiciclină pentru uz stomatologic și procedeu de obținere a acesteia” se referă la o membrană de colagen fibrilar tip I sub formă de gel, combinat cu hiolat de doxiciclină, utilizată în stomatologie, ca tratament pentru infecțiile parodontale și gingivale, și la un procedeu de obținere a acesteia. Soluția de Doxiciclină este încorporată și omogenizată în gelul de colagen, iar compoziția rezultată sub formă de gel se liofilizează 48 h, rezultând o folie spongioasă densă, de culoare galben-verzui, care se presează la rece, obținându-se membrana de colagen cu Doxiciclină, pentru uz stomatologic. Spre deosebire de matricea din prezenta propunere, această membrană nu reprezintă o structură tridimensională care să asigure suportul țesuturilor parodontale în timpul proceselor de regenerare. În plus, rata de resorbție a colagenului este mai rapidă decât a nanofibrelor biocompatibile de acid polilactic, motiv pentru care eliberarea agentului terapeutic din această membrană este pe o perioadă de timp mai scurtă.

Brevetul de invenție US20090028921A1 “Electrospun ceramic-polymer composite as a scaffold for tissue repair” prezintă metoda de preparare a unei matrici tridimensionale de nanofibre formate dintr-un compozit electrofilat alcătuite dintr-o componentă ceramică bioactivă și o componentă polimerică. Matricea oferă osteoconductivitate și osteoinductivitate, proprietăți care sprijină osteogeneza și, prin urmare, facilitează repararea osoasă. Conform invenției, matricea trebuie să conțină minim 10% componentă ceramică pe bază de fosfat de calciu (20% hidroxiapatită și 80% fosfat tricalcic) și 60% compoziție polimerică (policaprolactonă). Metoda de obținere cuprinde următoarele etape: (a) pregătirea unui compozit ceramică-polimer; (b) electrospinning compozit ceramic-polimer și prin aceasta (c) depunerea matricii tridimensionale de fibre electrofilate cuprinzând compozitul

ceramică-polimer pe un colector. Brevetul de invenție US20090028921A1 se referă doar la dezvoltarea unui sistem matriceal tridimensional alcătuit dintr-o componentă ceramică bioactivă (care are un conținut de 20% hidroxiapatită) și o componentă polimerică, cu rol osteoconductiv și osteoinductiv, fără să se fi adăugat în compoziție niciun antibiotic;

Brevetul de invenție US8512741B2 “Electrospun calcium phosphate nanofibers” face referire la metoda de obținere a unei matrici de nanofibre de fosfat de calciu cuprinzând nanofibre de fosfat de calciu cristaline dispersate aleatoriu, precum și sinteza de nanofibre egg-shell de fosfat de calciu, alcătuite dintr-un miez polimeric și un înveliș de fosfat de calciu, dispersate aleatoriu. Nanofibrele sunt sintetizate prin metoda sol-gel combinată cu electrospinning. Diametrul optim al nanofibrelor este cuprins între 100 și 200 nm. Matricele de nanofibre pot fi utilizate pentru cultivarea celulelor osoase și dentare și ca implanturi pentru tratarea bolilor și defectelor osoase, dentare sau parodontale. Brevetul de invenție “US8512741B2 se referă doar la dezvoltarea unui sistem matriceal de nanofibre de fosfat de calciu cu rol osteoconductiv și osteoinductiv, fără să se fi adăugat în compoziție niciun antibiotic.

Brevetul de invenție EP1964582B1 “Biocompatible material having biocompatible non-woven nano- or micro-fiber fabric produced by electrospinning method” se referă la un material biocompatibil care cuprinde o rețea din nano sau microfibră biocompatibilă produsă printr-o metodă de electrofilare. Materialul biocompatibil poate fi folosit ca o membrană de regenerare tisulară ghidată sau o membrană de regenerare osoasă ghidată în defectele osului alveolar. Spre deosebire de matricea din prezenta propunere, acest material nu conține substanțe antibiotice și nu are efect antimicrobian și de modulare a răspunsului imuno-inflamator de la nivelul situsului parodontal afectat.

Brevetul de invenție CN105031739A “Doxycycline-hyclate-carried GTR/GBR composite membrane and preparation method thereof” prezintă o membrană compozită GTR (Guide Tissue Regeneration)/GBR (Guide Bone Regeneration) încărcată cu doxiciclină-hiclat și o metodă de preparare a acesteia și aparține domeniului tehnic al medicamentelor. Membrana compozită GTR/GBR are o structură cu trei straturi, în care stratul de suprafață superior, stratul de suprafață inferior și stratul sandwich sunt toate fabricate prin electrofilare în secvență; stratul de suprafață superior și stratul de suprafață inferior sunt preparate dintr-un material polimeric natural și o soluție mixtă prin care materialul polimeric este sintetizat; stratul sandwich este un strat membranar preparat dintr-o soluție pe bază de doxiciclină-hiclat prin care este sintetizat materialul polimeric. Metoda de electrofilare permite eliberarea continuă lentă a medicamentului. Cele două straturi de suprafață ale membranei compozite servesc nu numai ca bariere poroase pentru a controla rata de eliberare a medicamentului, astfel încât să realizeze o eliberare continuă lentă a medicamentului, ci și previn contactul direct între medicament și țesuturi pentru a îmbunătăți compatibilitatea dintre țesuturi și membrană astfel încât să fie mai propice reparației și regenerării țesuturilor. Spre deosebire de matricea din prezenta propunere, această membrană nu este biodegradabilă și nu este destinată aplicației în pungile parodontale.

Brevetul de invenție WO/2018/033570 “Composition comprising self-assembling peptides for use in treatment of gingivitis, periodontitis and/or peri-implantitis” reprezintă o compoziție sub formă de hidrogel care cuprinde peptide specifice cu auto-asamblare, care sunt capabile să se auto-asambleze la un pH sub 7,5. Compoziția conține

81

taurolidină, clorhexidină, doxiciclină, tetraciclină, azitromicină și minociclină, are efecte antimicrobian, antibiotic, anti-inflamator sau antiseptic, prin care reduce invazia bacteriilor din cavitatea orală în punga parodontală timp de 3 până la 7 zile. Spre deosebire de matricea din prezenta propunere, această compoziție are remanență redusă la nivelul pungilor parodontale și nu prezintă eliberare controlată și prelungită a agenților activi.

Brevetul de invenție KR20160129982A “Mussel adhesive protein-derived bone binder for preventing or treating periodontal disease and method for preparing the same” se referă la un liant osos pentru prevenirea sau tratarea bolii parodontale prin utilizarea unui compozit dopa-Fe-(III) pe baza unei proteine adezive de midii care are un medicament încărcat în aceasta. Liantul osos conform prezentei invenții este produs prin utilizarea unui complex de metal-compus catecol, în mod specific, un compozit dopa-Fe(III) pe baza unei proteine adezive de midii. Produsul prezintă biocompatibilitate, asigură adezivitate la os și viteza de eliberare a medicamentului poate fi controlată. Liantul osos este eficient în prevenirea sau tratarea bolii parodontale și poate fi util în efectuarea unui implant într-o zonă cu volum osos redus. Spre deosebire de matricea din prezenta propunere, acest liant osos nu conține substanțe cu efect antimicrobian nu are efect antimicrobian și de modulare a răspunsului imuno-inflamator de la nivelul situsului parodontal afectat.

Brevetul de invenție PL228729B1 “Biodegradable, polymer system for the local releasing of medicine to be used in the treatment of parodontium diseases and method for producing it” reprezintă un sistem polimeric biodegradabil de eliberare locală a medicamentului pentru utilizare în tratamentul bolii parodontale; este un compozit dintr-un poliester carbonat alifatic și un policarbonat alifatic sau/și amestecuri ale acestora, de preferință din poli(ϵ -caprolactonă-co-trimetilenă). Copolimerii conțin un antibiotic (tetraciclină, doxiciclină) dispersat și/sau dizolvat în matrice, și/sau un antiseptic (clorhexidină) sau/și metronidazol sau/și triclosan. Spre deosebire de matricea din prezenta propunere, acest sistem polimeric nu are proprietăți de modulare a procesului imuno-inflamator local prin controlul eliberării citokinelor proinflamatoare la nivelul țesuturilor parodontale.

Brevetul de invenție TW202146002A “Cellulose nanofiber having antibacterial activity against periodontal pathogen and prepared by loading k-carrageenan oligosaccharide with surfactant and preparation method thereof capable of greatly enhancing the treatment of periodontal disease” este o nanofibră de celuloză având activitate antibacteriană împotriva patogenilor parodontali și preparată prin încărcarea oligozaharidei k-caragenan cu agent activ de suprafață, iar activina are activitate antibacteriană împotriva patogenilor parodontali. Nanofibra poate fi folosită pentru obținerea de membrane nanofibroase utilizate pentru tratamentul parodontitei. Spre deosebire de matricea din prezenta propunere, această material nu conține substanțe antibiotice și nu are efect de modulare a răspunsului imuno-inflamator de la nivelul situsului parodontal afectat.

Brevetul de invenție CN111818929A “Compounds, compositions and methods for treating and/or preventing periodontal disease” prezintă o metodă de tratare sau prevenire a bolii parodontale bazată pe administrarea unei cantități eficiente dintr-un inhibitor al ectonucleotid pirofosfatază/fosfodiesteraza-1. Efectul inhibitor al ENPP1 este util pentru prevenirea și tratarea bolii parodontale la indivizii cu defecte genetice care au ca rezultat formarea deficitară sau minimă a cimentului, cu scopul de a crește formarea de ciment și,



ulterior, de a crește atașarea noului ligament parodontal și formarea osului alveolar. Spre deosebire de matricea din prezenta propunere, acest compus nu conține substanțe antimicrobiene și nu are proprietăți de modulare a procesului imuno-inflamator local prin controlul eliberării citokinelor proinflamatoare la nivelul țesuturilor parodontale. **Brevetul de invenție US2022011119A1 “Host modulating and tissue regenerative hydrogel compositions and methods of their delivery to periodontal and peri-implant tissues”** face referire la o nouă utilizare a hidrogelurilor terapeutice în tehnici non-chirurgicale pentru a promova vindecarea și regenerarea țesuturilor parodontale. Compoziția pe bază de hidrogel are efecte terapeutice și regenerative. Aplicarea lor nechirurgicală în situsurile de tratament parodontal este un adjuvant în tratamentul bolii parodontale și peri-implantitei. Hidrogelul de acid hialuronic biomimetic terapeutic steril la care sunt adăugați un agent de modulare a gazdei (tetrahidrocurcuminoizi), și un agent suplimentar de regenerare tisulară în țesutul conjunctiv gingival este injectat în punga parodontală. Spre deosebire de matricea din prezenta propunere, acest hidrogel nu conține substanțe antibiotice cu activitate antimicrobiană și nu prezintă posibilitatea eliberării controlate, susținute și prelungite a agentului terapeutic la nivelul țesuturilor parodontale.

Materialele menționate mai sus, se confruntă cu multiple **neajunsuri** (așa cum au fost specificate anterior), motiv pentru care **apare necesitatea realizării unui sistem matriceal cu efect antimicrobian local și imunomodulator general.**

Scopul acestei invenții este obținerea unei matrici cu efect antimicrobian local și imunomodulator general pe bază de Doxiciclină încapsulată în nanofibre de acid polilactic și hidroxiapatită pentru a asigura un tratament multimodal al bolii parodontale.

Problemele tehnice pe care le rezolvă invenția sunt: (i) eliberare controlată a Doxiciclinei cu efect antimicrobian local, (ii) eliberare lentă a Doxiciclinei la nivelul pungii parodontale cu efect imunomodulator general, (iii) efect aditiv, antimicrobian local al nano-Hap din nano-fibre și (iv) tratamentul multimodal al bolii parodontale.

În continuare, se dă un **exemplu de realizare a invenției**. De asemenea, este prezentat un model de testare a materialului realizat conform invenției.

Realizarea sistemului matriceal compozit din PLA/HAP/Doxy preparate prin încapsularea Doxiciclinei în nanofibre presupune următoarele etape:

Etapa 1. Prepararea hidroxiapatitei (HAP). Hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, HAP) s-a preparat prin metoda coprecipitării:

$$10\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + 6(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4 + 8\text{NH}_4\text{OH} \rightarrow \text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2 + 20\text{NH}_4\text{NO}_3 + 46\text{H}_2\text{O}$$

O soluție 0,15 M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (soluția A) se adaugă la o soluție 0,09 M $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (soluția B) sub agitare continuă. Apoi, se adaugă o soluție de amoniac (25%) (soluția C) pentru a ajusta pH-ul amestecului la 11. Amestecul obținut se agită la temperatura ambiantă timp de 24 ore, apoi se filtrează și se spală de trei ori cu apă distilată. În continuare, pentru prepararea matricii se folosește precipitatul alb rezultat. Monitorizarea pH-ului și a temperaturii în timpul procesului de preparare a HAP se realizează la distanță prin intermediul IoT [Barabas, 2020].

Etapa 2. Adsorbția Doxyciclinei (Doxy) pe HAP. Adsorbția Doxy pe HAP se realizează folosind concentrații inițiale de Doxy diferite (3...20 g/L). Pentru adsorbția Doxy pe HAP se amestecă 625 mg de HAP și 10 ml de soluție Doxy cu concentrații inițiale diferite. Amestecul se agită timp de 24 ore la 700 rpm utilizând un agitator magnetic. Apoi, amestecul se centrifughează timp de 20 min la 10000 rpm. În urma centrifugării se obține o fază solidă și o fază lichidă. Faza solidă se utilizează în continuare sub formă neuscată.

Etapa 3. Prepararea soluției de acid polilactic (PLA). Se prepară o soluție 5% PLA, astfel: 0,5g PLA se dizolvă într-un amestec de diclorometan și cloroform (6:4 vol%) și se agită timp de 24 ore.

Etapa 4. Prepararea membranelor de PLA/HAP/Doxy. Faza solidă rezultată (pct.2) se adaugă la soluția de PLA (pct. 3) și se agită la temperatura ambiantă timp de 24 ore. În continuare, din soluția rezultată se obțin nanofibre cu ajutorul tehnicii de *electrospinning*. Nanofibrele au fost obținute (pe baza experimentelor preliminare) la temperatura ambiantă, tensiune de 25-27 kV, distanță de colector de 15 cm și o viteză de alimentare de 1 mL/h. Soluțiile și amestecurile inițiale se distribuie dintr-o seringă de 10 mL, iar nanofibrele se colectează pe hârtie cerată, de pe care membranele rezultate au putut fi îndepărtate cu ușurință.

Caracteristicile sistemelor matriciale compozite PLA/HAP/Doxy

Proba (matrice) obținută prin încapsularea Doxy (0,7% Doxy sub formă de soluție apoasă) în structura fibrelor a fost analizată prin diferite metode.

- Analizele termogravimetrice (TG) și termice diferențiale (DTA) cu ajutorul TA Instruments SDT Q600 la o viteză de încălzire de 10 °C/min, până la 1000 °C sub atmosferă de azot.
- Morfologia fibrelor încapsulate a fost examinată prin microscopie electronică de baleiaj (SEM) folosind un microscop CFEG SEM Hitachi SU8230 .
- Analiza de desorbție cu ajutorul unui spectrofotometru cu fascicul dublu Jasco V-650 UV-VIS .
- Dozarea Doxyciclinei hclate din diverse matrici s-a realizat printr-o metodă HPLC validată, obținându-se o curbă de calibrare care s-a dovedit a fi liniară în domeniul 5-100 µg/mL, la o lungime de undă de 365 nm.

> Analiza termică

Nanofibrele compozite prezintă rezistență termică până la aproximativ 325 °C, după care se observă o pierdere bruscă în greutate. Descompunerea termică a matricii PLA+HAP@Doxy (**Figura 1**) ne arată în plus o creșterea a pierderii de masă (~3%) în comparație cu PLA. Această diferență în comportamentul termic al PLA-HAP cu Doxy poate fi atribuită adsorbției cu succes a Doxy pe PLA-HAP.

Curbele TG (negru)/DTA (roșu) ale membranei PLA+HAP@Doxy obținută prin electrospinning reprezintă **Figura 1**.

> Microscopie electronică de baleiaj (SEM)

Imaginile SEM (**Figura 2a**) arată fibre orientate aleatoriu cu nanopori observați pe suprafața nanofibrelor (**Figura 2b**, săgeata roșie).

Imagini SEM ale matricei PLA+HAP@Doxy obținută prin electrospinning reprezintă **Figura 2 (a, b)**.

Mecanismul de formare a structurii poroase a fibrelor poate fi atribuit procesului de separare a fazelor polimer-solvent, care are loc în timpul procesului de electrospinning. Morfologia și structura interioară a fibrelor pot fi controlate prin ajustarea raportului între solvenți. Acest tip de structură îmbunătățește funcționalitatea nanomaterialelor și îmbunătățește conectivitatea porilor și suprafețele nanofibrelor obținute prin electrospinning .

➤ **Analiza eliberării de medicament în fluid biologic simulat (SBF)**

Profilul de eliberare al Doxy în proba HAP-Doxy încapsulată în fibre de PLA este prezentat în **Figura 3**. Disoluția medicamentului arată o eliberare susținută în SBF. După 96 h, s-a eliberat ~ 6,08% Doxy. Eliberarea medicamentului din fibre este un proces destul de complex, influențat de natura medicamentului, polimerului, aditivilor și solventului, care indirect afectează eliberarea medicamentului. S-a observat că în cazul probelor cu conținut ridicat de Doxy, o cantitate mare de substanță activă determină o scădere în viteza de eliberare a medicamentului [Sebe, 2015] și, invers, o cantitate mică de substanță activă poate duce la o eliberare accelerată [Sun, 2013; Farkas, 2022].

➤ **Dozarea Doxiciclinei hiclitate din diverse matrici cu ajutorul HPLC** (a se vedea **Figura 4**)

Evaluarea *in vitro* a sistemelor matriceale obținute prin electrospinning

Un număr de **5 sisteme matriceale au fost testate**, cu compoziții și concentrații diferite PLA, HAP, Doxiciclină, după cum sunt descrise în **Figura 5**.

Testarea microbiologică a activității antimicrobiene ale materialelor testate s-a realizat în condiții de anaerobioză, la o temperatură de $37 \pm 0.1^\circ\text{C}$, pe două dintre principalele specii parodontopatogene: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 29522 și *Porphyromonas gingivalis* ATCC -33277. Tulpinile celulare au fost în stare liofilizată, cu regenerare pe agar cu sânge (NutriSelect® Plus), iar testarea s-a realizat din prima subcultură.

Activitatea antibacteriană a celor nouă compuși s-a testat prin metoda difuzimetrică, luându-se ca model tehnica descrisă de *Clinical and Laboratory Standards Institute* (Ediția 29, M100-2019) și *American Society for Microbiology*© 2016, realizându-se unele modificări adaptate la compușii testați. Din culturile microbiene de 7 zile s-a realizat inoculul cu densitate de 0.5 standard McFarland (106UFC/ml) care a fost dispersat cu tamponul steril pe suprafața mediului de testare.

Prepararea compușilor pentru testare s-a realizat prin adăugarea unei cantități de 0,0100 g de compus în 500μl soluție salină sterilă (NaCl 0,9%) și ulterior omogenizarea amestecului la 250 rpm, timp de 60 de minute, la temperatura $22 \pm 2^\circ\text{C}$.

După 15 minute de la inundarea plăcilor cu inocul s-au amplasat câte 3 microcomprimate, dispuse radial, pe placa cu inocul. Pentru fiecare compus s-a utilizat o

cantitate de 30 μ l care a fost depusă pe microcomprimatul steril, cu un diametru de 10mm. După plasarea compuşilor în placa de testat, acestea au fost introduse în sistemul de incubat anaerob tip GENbag-GENbox, la temperatura de 37°C. Starea de anaerobioză a fost indusă cu ajutorul sistemului de generare atmosferă anaerobă (Millipore), iar validarea acesteia a fost realizată cu ajutorul indicatorului de verificare a mediului anaerob (Millipore).

Citirea plăcilor a fost realizată după 7 zile de incubare, măsurând diametrul zonelor de inhibiție cu şublerul electronic și exprimate în mm cu două zecimale. S-au realizat teste de sensibilitate martor a acestor tulpini și pe patru tipuri de antibiotice utilizate în terapia afecțiunilor dentare (microcomprimate Liofilchem Amoxicilină 30, Ampicilină 25, Metronidazol 5 și Doxiciclină 2). Testele au fost repetate de 3 ori realizându-se o medie a diametrelor zonelor de inhibiție exprimată în mm.

Coloniile obținute au fost optime, având morfologie caracteristică speciilor testate (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 29522 și *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277), după 7 zile de incubare la temperatura de 37°C, în condiții de anaerobioză, pe mediul cu sânge de oaie 5% (Figuri 6 și 7).

Realizarea testelor de sensibilitate din subculturi primare în aceleași condiții de incubare a permis observarea efectului antibacterian al sistemelor matriceale dezvoltate și a antibioticelor testate pe cele două tulpini bacteriene. Rezultatele obținute la cele trei încercări evidențiază faptul că nu sunt diferențe majore între diametrele zonelor de inhibiție pe tip de compus și specie microbiană, între încercări, aspect care dovedește o reproductibilitatea testelor în condiții similare.

Rezultatele obținute la testarea celor 5 sisteme matriceale dezvoltate pe specia *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* relevă faptul că zonele cele mai mari de inhibiție și deci efectul antibacterian testat *in vitro* a fost obținut pentru probele A și B, urmat de proba C, iar cele mai mici zone de inhibiție bacteriană au fost constatate la produșii D și E (cu lipsa inhibiției în plăcile testate la ultimul compus) (Tabel 1). Există diferențe statistice semnificative între probe în funcție de concentrația de antibiotic, respectiv lipsa acestuia. Deși proba D nu are în compoziție Doxiciclină, totuși se observă un efect antimicrobian datorat conținutului de Hap, aspect însă nerelevat pentru Proba E care nu conține Hap (Figura 8).

Tabel 1. Diametrele zonelor de inhibiție în mm pentru probele testate pe tulpina de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Specia bacteriană	Nr. încercări	Compuși testați				
		Proba A	Proba B	Proba C	Proba D	Proba E
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	Încercare 1	33,71	30,81	22,40	12,18	12,19
	Încercare 2	32,28	32,37	18,85	11,40	0,00
	Încercare 3	32,85	31,52	18,42	12,02	0,00
	Medie	32,95	31,57	19,89	11,87	4,06

Rezultatele obținute la cele trei încercări pentru probele testate pe specia *Porphyromonas gingivalis* evidențiază faptul că zonele cele mai mari de inhibiție și deci efectul antibacterian testat *in vitro* a fost obținut pentru sistemele matriceale dezvoltate A, B

și C, iar cele mai mici zone de inhibiție bacteriană au fost constatate la sistemele matriceale D și E (cu lipsa inhibiției în plăcile testate la ultimul compus) (Tabel 2). Există diferențe statistice semnificative între probe în funcție de concentrația de antibiotic, respectiv lipsa acestuia. Deși Proba D nu are în compoziție Doxicilină, totuși se observă un efect antimicrobian datorat conținutului de Hap (Figura 9).

Tabel 2. Diametrele zonelor de inhibiție în mm la compuşii testați pe tulpina de *Porphyromonas gingivalis*.

Specia bacteriană	Nr. încercări	Sistemele matriceale testate				
		Proba A	Proba B	Proba C	Proba D	Proba E
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Încercare 1	32,28	31,70	27,79	12,19	11,25
	Încercare 2	34,87	33,15	34,19	11,21	12,18
	Încercare 3	32,14	34,72	27,73	12,09	0,00
	Medie	33,10	33,19	29,90	11,83	7,81

Se observă un comportament similar al celor două specii bacteriene *in vitro*, prin metoda difuzimetrică, cu o sensibilitate bacteriană evidentă la sistemele matriceale A, B și C.

Testarea sensibilității antimicrobiene a celor două tulpini cu cele **patru antibiotice convenționale** a evidențiat o sensibilitate bună cu diferențe între antibiotice, în funcție de tulpina test (Tabel 3).

Tabel 3. Diametrele zonelor de inhibiție în mm la antibioticele convenționale testate pe tulpinile de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* și *Porphyromonas gingivalis*.

Specia bacteriană	Antibiotice testate			
	Amoxicilină 30µg	Ampicilină 25 µg	Doxicilină 2 µg	Metronidazol 5 µg
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	13,37	17,11	17,83	26,65
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	25,90	21,24	28,74	27,75

Testele efectuate asupra celor două specii celulare au demonstrat eficiența Doxicilinei asupra bacteriilor parodontopatogene. Comparativ cu cele trei antibiotice frecvent folosite ca adjuvante în terapia non-chirurgicală parodontală, Doxiciclina dovedește inhibiții comparabile față de *A. actinomycetemcomitans* și capacități superioare împotriva *P. gingivalis* (tulpină implicată în formele agresive și reziliente de boală parodontală).

Speciile utilizate pentru studiul *in vitro*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 29522 și *Porphyromonas gingivalis* ATCC -33277, necesită condiții speciale de cultură (temperaturi controlate și condiții de anaerobioză), astfel crescând-se gradul de dificultate al testărilor.

Sistemele matriceale testate conținând Doxicilină (A, B și C) au demonstrat o capacitate inhibitorie comparabilă asupra celor două specii celulare testate. În cazul A.

75

actinomicetemcomitans, puterea inhibitorie pe culturile celulare a fost direct proporțională cu concentrația de substanță antibiotică. În cazul *P. gingivalis*, zonele inhibitorii au avut dimensiuni similare, indiferent de concentrația substanței antibiotice.

Având în vedere că din soluția stoc de 15 g/L Doxiciclină (Proba B) s-au realizat prin electrospinning matrici cu un conținut de 18 μg Doxiciclină/1 mg fibră, iar din soluția stoc de 7 g/L Doxiciclină (Proba C) matrici cu un conținut de 8.4 μg Doxiciclină/1 mg fibră, respectiv punându-se în balanță efectele dorite (doze de antibiotic cu concentrația cea mai mică eficientă, raportată la zona inhibitorie) comparativ cu efectele secundare care pot apărea în timp la administrarea antibioticelor, cu apariția speciilor rezistente la antibioterapie, s-a decis continuarea testărilor *in vivo* cu **sistemul matriceal C: HAP, PLA 5%, Doxiciclină 0,7%**.

Evaluarea *in vivo* pe model animal a efectului imunomodulator general al sistemului matriceal (HAP, PLA 5%, Doxiciclină 0,7%)

Având în vedere importanța unui diagnostic precoce al parodontitei, precum și efectul general pe care îl are această boală, s-a propus utilizarea proteinelor și enzimelor ca biomarkeri pentru progresia bolii parodontale. Concentrațiile Matrix metaloproteinazei 8 (MMP-8) în boala parodontală sunt mai mari decât la pacienții sănătoși, aceasta fiind responsabilă de scindarea fibrelor de colagen din parodonțiu [Sam, 2014]. Interleukina 1 (IL-1), interleukina 6 (IL-6) și factorul de necroză tumorală alfa (TNF-α) sunt citokine proinflamatorii legate de inițierea inflamației în țesuturile parodontale și de resorbția osoasă [Madhuri, 2016; Singh, 2013]. Mai mult, aceste citokine sunt implicate în limitarea potențialului reparator al parodonțiului, prin inducerea apoptozei celulelor responsabile de sinteza colagenului [Madhuri, 2016]. Având în vedere rolurile lor majore în stadiile incipiente ale parodontitei și variația lor în concentrațiile salivare și plasmatică, aceste molecule au fost propuse și utilizate ca biomarkeri pentru screening-ul pacientului în cabinetul stomatologic [Liao, 2005; Raja, 2009].

În acest sens s-a evaluat efectul *in vivo* al sistemului matriceal dezvoltat (Proba C) care conținea **HAP, PLA 5%, Doxiciclină 0,7%**.

Studiul a fost aprobat de Comisia de Etică a Universității de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca (nr.47/01.03.2021) și autorizat de către Autoritatea Națională Sanitară Veterinară și pentru Siguranța Alimentelor (nr. 266/28.06.2021).

Evaluarea *in vivo* a sistemului matriceal s-a realizat prin tratarea parodontitei localizate indusă specimenelor (șobolanii rasă Wistar, de sex masculin) prin tehnica ligaturii cu fir multistratificat de mătase, cu scopul retenției plăcii bacteriene și inducerea inflamației locale. Specimenele au fost împărțiți în loturi diferite din punct de vedere al inducerii bolii și tratamentelor administrate: lotul MARTOR NEGATIV, cărora nu li se induce boala parodontală și nu li se aplică tratamente **Faza 1**; lotul MARTOR POZITIV, cărora li se induce boala parodontală, dar nu li se aplică tratamente **Faza 2**; lotul TEST 1 (T1), cărora li se induce boala parodontală și li se aplică tratament prin chiuretaj radicular, asociat cu inserarea sistemului matriceal obținut prin electrospinning și aplicarea unui sistem mucoadeziv (ca sigilant al pungii parodontale) **Faza 3 (T1)**; lotul TEST 2 (T2), cărora li se induce boala parodontală și li se aplică tratament doar prin chiuretaj radicular **Faza 3 (T2)**.

Probele biologice recoltate au fost sângele, prin tehnica abordului retroorbital, și saliva stimulată prin tehnica badijonării cu soluție de acid citric. Prelevarea probelor s-a

realizat în fiecare etapă a studiului. Recoltarea probelor de sânge s-a realizat în vacutainere conținând citrat de sodiu 3,2%, pentru a preveni coagularea acestuia. Ulterior, recipientele au fost introduse în centrifugă pentru 10 min, la 4000 rotații per minut, pentru obținerea plasmei. Aceasta din urmă a fost transferată în recipiente Eppendorf și depozitată la o temperatură controlată de -80°C. Din plasma, prin tehnică Elisa, s-au determinat următorii parametrii: IL-1, IL-6 și TNF- α , în vederea evaluării eficacității și efectului imunomodulator a tratamentelor administrate.

În vederea recoltării salivei, cavitatea orală a șobolanilor a fost badijonată cu o soluție de acid citric, obținută prin dizolvarea a 8 g acid citric în 20 ml soluție clorură de sodiu 0,9%. Aceasta are rolul de a stimula salivarea, astfel încât o cantitate de aproximativ 2 ml a fost recoltată în recipiente Eppendorf sterile. Din saliva recoltată s-a determinat activitatea MMP-8, prin tehnică Elisa.

Inducerea parodontitei și tratamentele aplicate au fost realizate sub anestezie generală. Aceasta a fost obținută prin administrarea intramusculară a unui amestec de 0,2 ml Ketamină soluție 10% și 0,05 ml Xilazină soluție 2%.

La 14 zile de la aplicarea firelor de mătase circumdentare la nivelul incisivilor frontali inferiori s-a indus parodontita localizată, iar examinarea clinică a relevat o inflamație severă și o acumulare crescută de placă bacteriană la nivel gingival (**Figura 10, a și b**).

În urma evaluării indexului gingival, s-a observat o creștere a valorilor identificate între fazele 1 și 2 ale studiului. Astfel, dacă în prima fază a studiului toți subiecții prezintă un indice gingival de valoare 0, în faza a doua se observă o creștere a acestuia și o distribuție a indexului gingival pe întreaga plajă de valori (**Figura 11**).

În ceea ce privește mobilitatea dentară observată la nivelul incisivilor inferiori în prima fază a experimentului, 50 de specimene au prezentat o mobilitate dentară gradul 0, în timp ce 10 specimene au prezentat o mobilitate dentară gradul 1. Două săptămâni mai târziu, în cea de-a doua fază a studiului, doar 5 specimene au prezentat o mobilitate dentară gradul 0, 14 au prezentat gradul 1, în timp ce 37 de specimene au prezentat o mobilitate gradul 2 și un specimen a prezentat gradul 3 (**Figura 12**). Mobilitatea dentară a fost evaluată în fiecare etapă a prezentului experiment, utilizând clasificarea propusă de *Xu Y. et al. (2006)*. Incisivii inferiori ai șobolanilor prezintă caracteristici fiziologice particulare, îndeosebi relevantă pentru acest parametru fiind o posibilă mobilitate ușoară, fiziologică, în sens mezio-distal. Astfel, se poate explica prezența indicelui de mobilitate grad 1 în cazul a zece dintre specimene (16,66%) în prima fază a studiului, înainte de aplicarea ligaturilor.

În urma dozării sistemului matriceal, probele obținute au avut o greutate medie de 5,79 mg (DS de 0,2 mg), având o distribuție uniformă în intervalul de 5,5 mg și 6,1 mg. La fiecare exemplar s-a inserat în pungile parodontale sistemul matriceal (Proba C) cu un conținut de 50.5 μ g Doxiciclină (lotul T1_Faza 3). Aplicarea noului material obținut prin electrospinning subiecților din lotul T1 nu a creat dificultăți tehnice, datorită localizării anterioare a dinților de tratat și, de asemenea, datorită structurii sale. Textura sistemului fibrilar permite modificarea consistenței de la un material moale, afânat, la unul mai dens, ușor de fultat, odată cu aplicarea forței necesare introducerii la nivel sulcular (**Figura 13, a și b**).

Evaluarea efectelor tratamentelor parodontale a fost realizată în cea de-a treia fază a studiului, la 4 săptămâni de la aplicarea sistemului matriceal.

Concentrația salivară de MMP-8 a relevat o valoare medie de 4.293 ng/ml (DS 0.788) în faza 1 a studiului, și a crescut la 6.078 ng/ml (DS 1.684) în a doua etapă a studiului, confirmând astfel o creștere a activității locale a colagenazei și confirmând prezența inflamației locale. După tratamentul parodontal, în faza 3 a experimentului, lotul T1 a avut o concentrație salivară de MMP-8 de 2.549 ng/ml, (DS 1.209), în timp ce grupul T2 a avut o concentrație de 4.471 ng/ml (DS 0.672). Concentrațiile mai mici ale MMP-8 salivare detectate după aplicarea tratamentului în grupul T1 comparativ cu grupul T2 subliniază efectul pozitiv pe care l-a avut biomaterialul testat asupra procesului de vindecare și rezoluției inflamației, validând astfel capacitățile biomaterialului în tratamentul bolii parodontale. Reprezentarea grafică a acestor valori și diferențele statistice relevante (testul t) pot fi găsite în **Figura 14**.

În ceea ce privește concentrațiile plasmatice ale IL-1 și TNF- α , s-au obținut rezultate similare. Concentrația de IL-1 a suferit o creștere la 14 zile (Lotul martor pozitiv), de la 28.54 ng/ml la 44.72 ng/ml, în timp ce concentrațiile de TNF- α au crescut de la 16.67 ng/ml la 18.7 ng/ml. În faza 3 a studiului clinic, concentrațiile plasmatice de IL-1 în grupul T1 au fost semnificativ statistic mai mici decât în grupul T2 (49.38 ng/ml și respectiv 67.95 ng/ml, $p = 0,0099$). De asemenea, concentrațiile plasmatice ale TNF- α au fost mai mici în grupul T1 decât în grupul T2 (13.36 ng/ml și respectiv 20.88 ng/ml), cu o diferență statistică între cele două valori ($p = 0,0017$) (**Figuri 15-16**). Aceste rezultate subliniază efectele pozitive pe care noul biomaterial le are în tratamentul bolii parodontale, precum și efectul imunomodulator sistemic. Concentrațiile plasmatice de IL-6 au rămas relativ constante pe parcursul celor trei faze ale experimentului, fără diferențe statistice între valorile înregistrate (**Figura 17**).

Avantajele invenției sunt: (i) eliberare controlată a Doxy cu efect antimicrobian local, (ii) eliberare lentă a Doxy la nivelul pungii parodontale cu efect imunomodulator general, (iii) efect aditiv, antimicrobian local al nano-Hap din nano-fibre și (iv) tratamentul multimodal al bolii parodontale.

Bibliografie

- Ahamed S., Jalaluddin M., Khalid I., Moon N., Shafi T.K., Ali F.M. The use of controlled release locally delivered 10% doxycycline hyclate gel as an adjunct to scaling and root planing in the treatment of chronic periodontitis: clinical and microbiological results. *J Contemp Dent Pract.* **2013**, *14*, 1080-1086.
- Barabás R., de Souza Avila E., Ladeira L.O., Mosqueira-Antonio L., Totots R., Simedru D., Bizo L., Cadar O. Graphene oxides/carbon nanotubes–hydroxyapatite nanocomposites for biomedical applications. *Arab. J. Sci. Eng.* **2020**, *45*, 219-227.
- Berglund J.D., Nerem R.M., Sambanis, A. Incorporation of intact elastin scaffolds in tissue-engineered collagen-based vascular grafts. *Tissue Eng.* **2004**, *10*, 1526-1535.
- Bhardwaj N., Kundu S.C. Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique.

- Biotechnol. Adv.* **2010**, *28*, 325-347.
- Braghirolli D.I., Steffens D., Pranke, P. Electrospinning for regenerative medicine: A review of the main topics. *Drug Discov. Today* **2014**, *19*, 743-753.
- Budai-Szűcs M., Léber. A, Cui L., Józó M., Vályi P., Burián K., Kirschweng B., Csányi E., Pukánszky B. Electrospun PLA fibers containing metronidazole for periodontal disease. *Drug Des. Devel. Ther.* **2020**, *14*, 233-242.
- Casper, C. L., Yamaguchi, N., Kiick, K. L. & Rabolt, J. F. Functionalizing electrospun fibers with biologically relevant macromolecules. *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 1998-2007.
- Cerere de brevet de invenție (OSIM) nr. a 2018 00995, data publicării cererii 29.05.2020, BOPI nr.5/2020, R. Barabás, L. Barabás, L. Bizo: "Sistem de monitorizare la distanță a unor parametri de reacție pentru obținerea hidroxiapatitei".
- Cho J.S., Yoo D.S., Chung, Y.C., Rhee S.H. Enhanced bioactivity and osteoconductivity of hydroxyapatite through chloride substitution. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, **2014**, *102*, 455-469.
- Dalton P.D., Woodfield T., Hutmacher D.W. SnapShot: Polymer scaffolds for tissue engineering snapshot: polymer scaffolds for tissue engineering. *Bone* 2008, **428**, 2004-2005.
- Duan B., Dong C., Yuan X., Yao K. Electrospinning of chitosan solutions in acetic acid with poly(ethylene oxide), *J. Biomat. Sci.-Polym. Ed.* **2004**, *15*, 797-811.
- Eskitoros-Togay M.S., Bulbul Y.E., Tort S., Korkmaz F.D., Acaturk F., Dilsiz N. Fabrication of doxycycline-loaded electrospun PCL/PEO membranes for a potential drug delivery system. *Int. J. Pharm.* **2019**, *565*, 83-94.
- Farkas N.I., Marincea L., Barabás R., Bizo L., Ilea A., Turdean G.L., Toşa M., Cadar O., Barbu-Tudoran L. Preparation and characterization of doxycycline-loaded electrospun PLA/HAP nanofibers as a drug delivery system. *Materials* **2022**, *15*, 2105.
- Garlotta, D. A literature review of poly(lactic acid). *J. Polym. Environ.* **2001**, *9*, 63-84.
- Geng X., Kwon O.H., Jang J. Electrospinning of chitosan dissolved in concentrated acetic acid solution. *Biomaterials* **2005**, *26*, 5427-5432.
- Gombotz W.R., Pettit D.K. Biodegradable polymers for protein and peptide drug delivery. *Bioconjug. Chem.* **1995**, *6*, 332-351.
- Graziani F., Karapetsa D., Alonso B., Herrera D. Nonsurgical and surgical treatment of periodontitis: how many options for one disease? *Periodontol.* **2000**, *75*, 152-188.
- Haider A., Haider S., Kang I. K. A comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanofibers in biomedical and biotechnology. *Arab. J. Chem.* **2018**, *11*, 1165-1188.
- Huang C., Thomas N.L. Fabricating porous poly(lactic acid) fibres via electrospinning. *Eur. Polym. J.* **2018**, *99*, 464-476.
- Hung S-L, Lin Y-W, Chen Y-T, Ling L-J. Attachment of periodontal ligament cells onto various antibiotics-loaded GTR membranes. *Int. J. Periodontics Restorative Dent.* **2005**, *25*, 265-275.
- Jin H.J., Fridrikh S.V., Rutledge G.C., Kaplan D.L. Electrospinning Bombyx mori silk with poly(ethylene oxide), *Biomacromolecules* **2002**, *3*, 1233-1239.
- Kenawy E.R., Bowlin G.L., Mansfield K., Layman J., Simpson D.G., Sanders E.H., Wnek G.E. Release of tetracycline hydrochloride from electrospun poly(ethylene-co-

- vinylacetate), poly(lactic acid), and a blend. *J. Control. Release* **2002**, *81*, 57-64.
- Khalf A., Madihally S.V. Modeling the permeability of multiaxial electrospun poly(ϵ -caprolactone)-gelatin hybrid fibers for controlled doxycycline release. *Mater. Sci. Eng. C* **2017**, *76*, 161-170.
- Kidoaki S., Kwon, I.K., Matsuda T. Mesoscopic spatial designs of nano- and microfiber meshes for tissue-engineering matrix and scaffold based on newly devised multilayering and mixing electrospinning techniques. *Biomaterials* **2005**, *26*, 37-46.
- Kim J., Grate J.W., Wang, P. Nanostructures for enzyme stabilization. *Chem. Eng. Sci.* **2006**, *61*, 1017-1026.
- Lamkhao S., Phaya M., Jansakun C., Chandet N., Thongkorn K., Rujijanagul G., Bangrak P., Randorn C. Synthesis of hydroxyapatite with antibacterial properties using a microwave-assisted combustion method. *Sci Rep.* **2019**, *9*, 4015.
- Liao S., Wang W., Uo M., Ohkawa S., Akasaka T., Tamura K., et al. A three-layered nano-carbonated hydroxyapatite/collagen/PLGA composite membrane for guided tissue regeneration. *Biomaterials*. **2005**, *26*, 7564-7571.
- Liu W.C., Liu W.C., Wang H.Y., Chem L.C., Juang S.W. Wu C., Ching R.J. Hydroxyapatite/tricalcium silicate composites cement derived from novel two-step sol-gel process with good biocompatibility and applications as bone cement and potential coating materials. *Ceram. Int.* **2019**, *45*, 5668-5679.
- Lu P., Ding B. Applications of electrospun fibers. *Recent Pat. Nanotechnol.* **2008**, *2*, 169-182.
- Madhuri SV. Membranes for periodontal regeneration. *Int J Pharm Sci Invent.* **2016**, *6*, 19-24.
- Madi M., Pavlic V., Samy W., Alagl A. The anti-inflammatory effect of locally delivered nano-doxycycline gel in therapy of chronic periodontitis. *Acta Odontol Scand.* **2018**, *76*, 71-76.
- Matthews J.A., Wnek G.E., Simpson D.G., Bowlin G.L. Electrospinning of collagen nanofibers. *Biomacromolecules* **2002**, *3*, 232-238.
- Mehrabanian M., Nasr-Esfahani M. HA/nylon 6,6 porous scaffolds fabricated by salt-leaching/solvent casting technique: effect of nano-sized filler content on scaffold properties. *Int. J. Nanomedicine* **2011**, *6*, 1651-1659.
- Mondal S., Hoang G., Manivasagan P., Kim H., Oh, J. Nanostructured hollow hydroxyapatite fabrication by carbon templating for enhanced drug delivery and biomedical applications. *Ceram. Int.* **2019**, *45*, 17081-17093.
- Newman M.G., Takei H., Klokkevold P.R., Carranza F.A. Newman and Carranza's Clinical Periodontology E-Book. Elsevier Health Sciences; 2018, p 1991.
- Papapanou P.N., Sanz M., Buduneli N., Dietrich T., Feres M., Fine D.H., et al. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J. Clin. Periodontol.* **2018**, *45*, S162-170.
- Pavlov M.P., Mano J.F., Neves N.M., Reis R.L. Fibers and 3D mesh scaffolds from biodegradable starch-based blends: Production and characterization. *Macromol. Biosci.* **2004**, *4*, 776-784.
- Pham Q.P., Sharma U., Mikos A.G. Electrospinning of polymeric nanofibers for tissue engineering applications: A review. *Tissue Eng.* **2006**, *12*, 1197-1211.

- Raja S., Byakod G., Pudakalkatti P. Growth factors in periodontal regeneration. *Int J Dent Hyg.* **2009**, *7*, 82-89.
- Rosso, F., Marino G., Giordano A., Barbarisi M., Parmeggiani D., Barbarisi A. Smart materials as scaffolds for tissue engineering. *J. Cell. Physiol.* **2005**, *203*, 465-470.
- Sam G., Pillai B.R.M. Evolution of barrier membranes in periodontal regeneration-“Are the third Generation Membranes really here?” *J. Clin. Diagn. Res.* **2014**, *8*, ZE14-ZE17.
- Sebe I., Szabó P., Kállai-Szabó B., Zelkó R. Incorporating small molecules or biologics into nanofibers for optimized drug release: A review, *Int. J. Pharmaceut.* **2015**, *494*, 516-530.
- Sharma B., Elisseeff J.H. Engineering structurally organized cartilage and bone tissues. *Ann. Biomed. Eng.* **2004**, *32*, 148-159.
- Singh G., Gokhale S.T., Manjunath S., Al-Qahtani S.M., Nagate R.R., Venkataram V., Joseph B. Evaluation of locally-administered controlled-release doxycycline hyclate gel in smokers and non-smokers in the management of periodontitis: An Indian study. *Trop. J. Pharm. Res.* **2021**, *20*, 1739-1747.
- Sinulingga K., Sirait M., Siregar N., Abdullah H. Synthesis and characterizations of natural limestone-derived nano-hydroxyapatite (HAp): a comparison study of different metals doped HAps on antibacterial activity. *RSC Adv.* **2021**, *11*, 15896-15904.
- Subbiah T., Bhat G.S., Tock R.W., Parameswaran S., Ramkumar S. S. Electrospinning of nanofibers. *J. Appl. Polym. Sci.* **2005**, *96*, 557-569.
- Sun X.Z., Williams G.R., Hou X.X., Zhu L.M. Electrospun curcumin-loaded fibers with potential biomedical applications, *Carbohydr. Polym.* **2013**, *94*, 147-153.
- Tan O.L., Safii S.H., Razali M. Commercial local pharmacotherapeutics and adjunctive agents for nonsurgical treatment of periodontitis: A contemporary review of clinical efficacies and challenges. *Antibiotics* **2019**, *9*, 11.
- Wang X., Wang J., Guan F., Cui L., Pan J., Wang Q., Zhu L., Achieving high electric energy storage in a polymer nanocomposite at low filling ratios using a highly polarizable phthalocyanine interphase, *J. Macromol. Sci. B.* **2014**, *37*-41.
- Xu C., Inai R., Kotaki M., Ramakrishna S. Electrospun nanofiber fabrication as synthetic extracellular matrix and its potential for vascular tissue engineering. *Tissue Eng.* **2004**, *10*, 1160-1168.
- Yabu H. Fabrication of nanostructured composite microspheres based on the self-assembly of polymers and functional nanomaterials. *Part. Part. Syst. Charact.* **2019**, *36*, 1-15.
- Yang, P., Quan Z., Li C., Kang X., Lian H., Lin H. Bioactive, luminescent and mesoporous europium-doped hydroxyapatite as a drug carrier. *Biomaterials* **2008**, *29*, 4341-4347.
- Yoo H.S., Lee E.A., Yoon J.J., Park T.G. Hyaluronic acid modified biodegradable scaffolds for cartilage tissue engineering. *Biomaterials* **2005**, *26*, 1925-1933.
- Zaikov G.E. Nanostructured fibers via electrospinning (Part II). *Appl. Nanotechnol. Mater. Appl.* **2016**, 281-324.
- Zhang Y., Ouyang H., Chwee T.L., Ramakrishna S., Huang Z.M. Electrospinning of gelatin fibers and gelatin/PCL composite fibrous scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* **2005**, *72*, 156-165.

REVENDICĂRI

1. Matrice cu efect antimicrobian local și imunomodulator **caracterizată prin aceea că** este realizată pe bază de Doxicilină încapsulată în nanofibre de acid polilactic și hidroxiapatită.

2. Matrice cu efect antimicrobian local și imunomodulator conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** presupune următoarele etape de realizare:

- Prepararea hidroxiapatitei (HAP);
- Absorbția Doxicilinei (Doxy) pe HAP;
- Prepararea soluției de acid polilactic (PLA);
- Prepararea membranelor de PLA/HAP/Doxy.

3. Matrice cu efect antimicrobian local și imunomodulator conform revendicării 2, **caracterizată prin aceea că** etapa preparării hidroxiapatitei (HAP) se realizează prin metoda coprecipitării $[10\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + 6(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4 + 8\text{NH}_4\text{OH} \rightarrow \text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2 + 20\text{NH}_4\text{NO}_3 + 46\text{H}_2\text{O}]$ și constă în următoarele subetape: o soluție 0,15 M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (soluția A) se adaugă la o soluție 0,09 M $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (soluția B) sub agitare continuă, după care se adaugă o soluție de amoniac (25%) (soluția C) pentru a ajusta pH-ul amestecului la 11; apoi amestecul obținut se agită la temperatura ambiantă timp de 24 ore, apoi se filtrează și se spală de trei ori cu apă distilată, iar în continuare, pentru prepararea matricii se folosește precipitatul alb rezultat.

4. Matrice cu efect antimicrobian local și imunomodulator conform revendicării 2, **caracterizată prin aceea că** etapa absorbției Doxicilinei (Doxy) pe HAP se realizează folosind concentrații inițiale de Doxy diferite (3...20 g/L); pentru adsorbția Doxy pe HAP se amestecă 625 mg de HAP și 10 ml de soluție Doxy cu concentrații inițiale diferite, mai apoi amestecul agitându-se timp de 24 ore la 700 rpm utilizând un agitator magnetic, iar ulterior amestecul se centrifughează timp de 20 min la 10000 rpm, etapă după care se obține o fază solidă și o fază lichidă, dintre care faza solidă se utilizează în continuare sub formă neuscată.

5. Matrice cu efect antimicrobian local și imunomodulator conform revendicării 2, **caracterizată prin aceea că** soluția de acid polilactic (PLA) preparată este de 5% PLA, obținându-se astfel: 0,5g PLA se dizolvă într-un amestec de diclorometan și cloroform (6:4 vol%) și se agită timp de 24 ore.

6. Matrice cu efect antimicrobian local și imunomodulator conform revendicării 2, **caracterizată prin aceea că** în etapa preparării membranelor de PLA/HAP/Doxy faza solidă rezultată în revendicarea 4 se adaugă la soluția de PLA din revendicarea 5 și se agită la temperatura ambiantă timp de 24 ore, iar în continuare, din soluția rezultată se obțin nanofibre cu ajutorul tehnicii de *electrospinning*, nanofibre obținute (pe baza experimentelor preliminare) la temperatura ambiantă, tensiune de 25-27 kV, distanță de colector de 15 cm și o viteză de alimentare de 1 mL/h; ulterior, soluțiile și amestecurile inițiale se distribuie dintr-o seringă de 10 mL, iar nanofibrele se colectează pe hârtie cerată, de pe care membranele rezultate au putut fi îndepărtate cu ușurință.

Figura 1. Curbele TG (negru)/DTA (roșu) ale membranei PLA+HAP@Doxy obținută prin electrospinning.

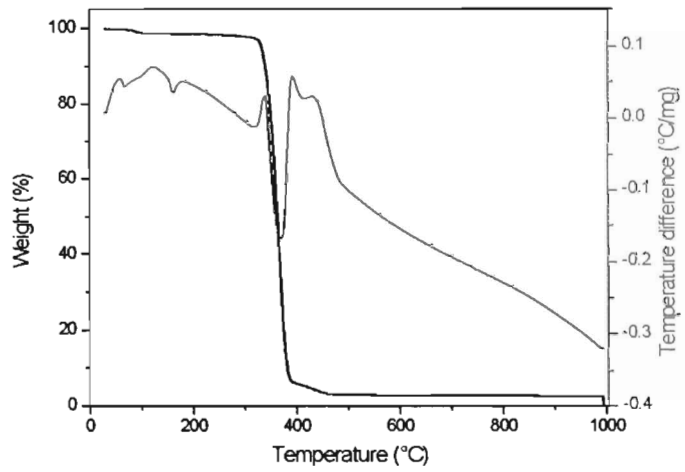


Figura 2. Imagini SEM ale matricea PLA+HAP@Doxy obținută prin electrospinning (a și b)

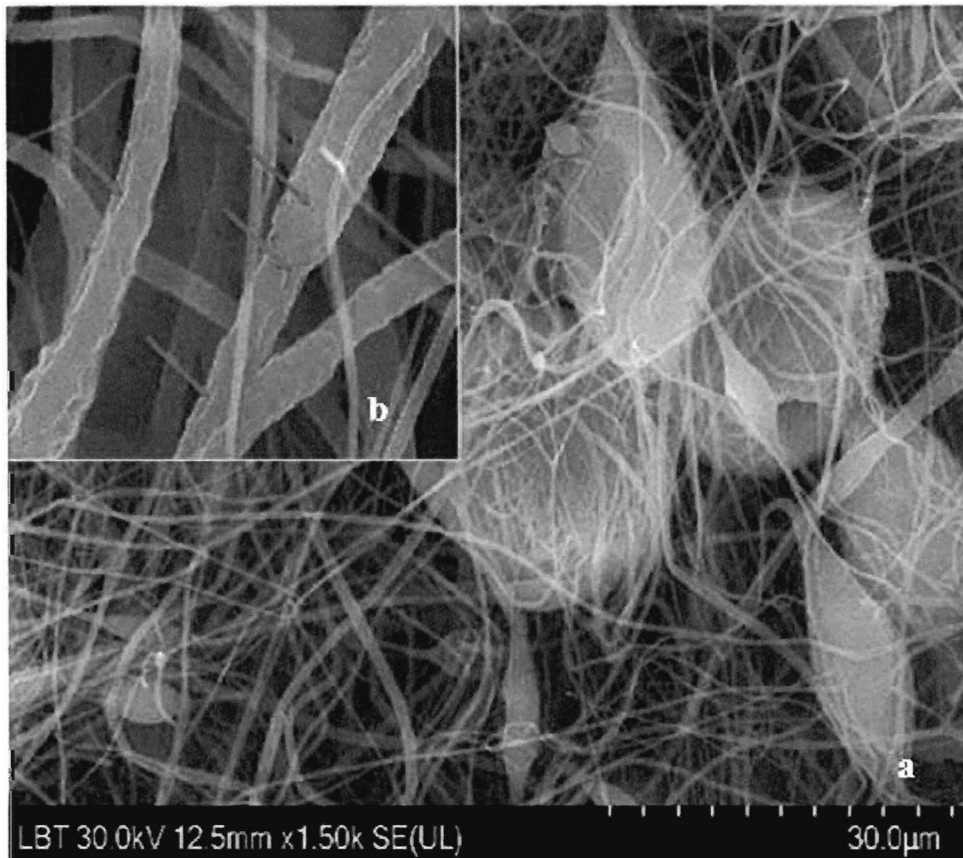


Figura 3. Profilul de eliberare (cumulativ) în SBF al Doxy încapsulată în nanofibre PLA-HAP.

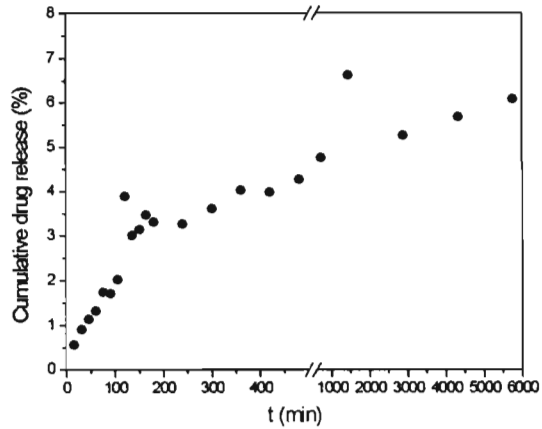


Figura 4. Cromatograma aferenta dozării Doxiciclinei hclate din fibre obținute prin electrospinning.

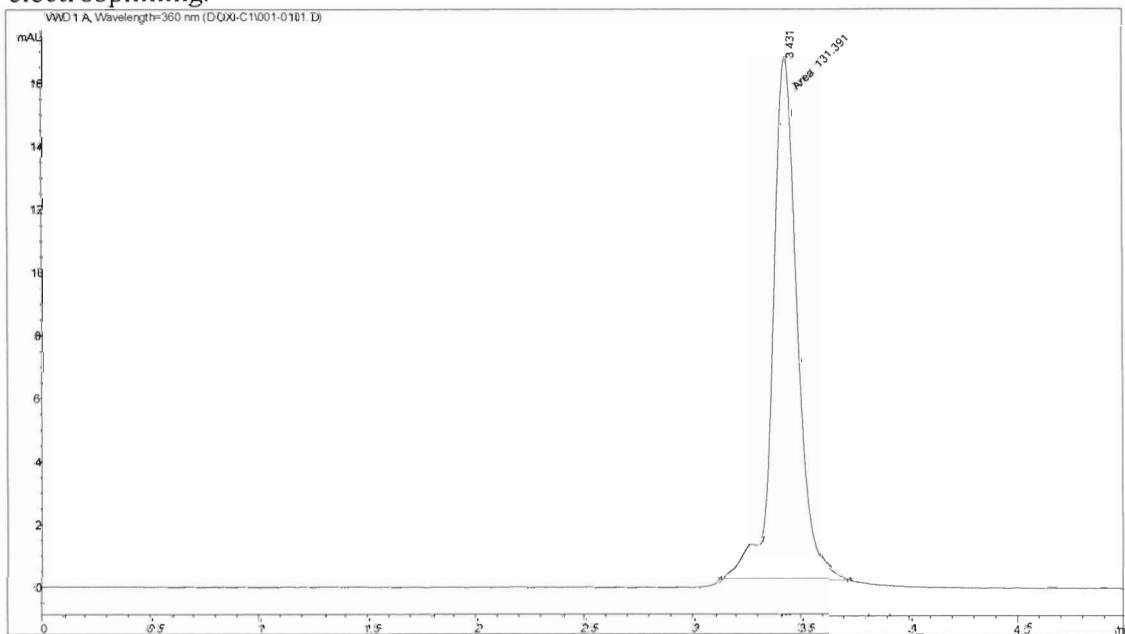


Figura 5. Sisteme matriceale testate *in vitro*.

<ul style="list-style-type: none"> •HAP •PLA 5% •Doxiciclină 20 g/l 	<ul style="list-style-type: none"> •HAP •PLA 5% •Doxiciclină 15 g/l 	<ul style="list-style-type: none"> •HAP •PLA 5% •Doxiciclină 7 g/l 	<ul style="list-style-type: none"> •PLA 5% •HAP/PLA = 1,25 	<ul style="list-style-type: none"> •Nanofibre pure PLA 5%
Proba A	Proba B	Proba C	Proba D	Proba E

Figura 6. Cultură de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* pe mediul agar cu sânge: imagine de ansamblu placă

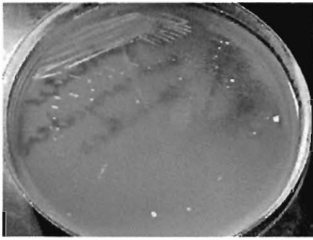
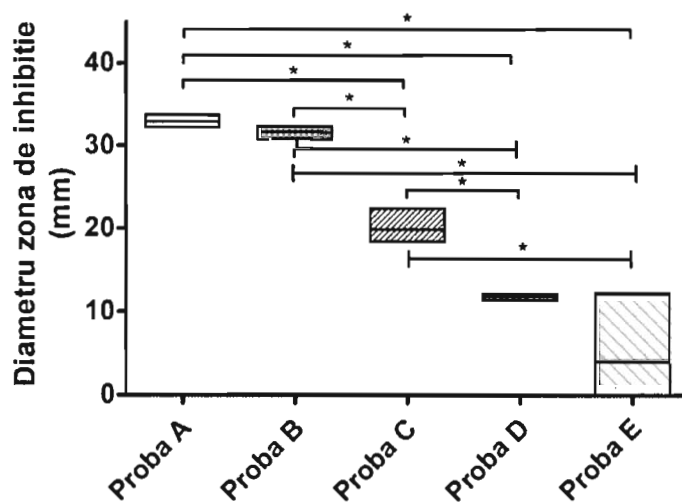


Figura 7. Cultură de *Porphyromonas gingivalis* pe mediul agar cu sânge: imagine de ansamblu placă



Figura 8. Comparație între zonele de inhibiție pentru cele cinci probe asupra *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

**Comparatie intre zonele de inhibitie ale probelor asupra
*Aggregatibacter actinomycetemcomitans***



* p < 0.05

Figura 9. Comparație între zonele de inhibiție pentru cele cinci probe asupra *Porphyromonas gingivalis*

**Comparatie între zonele de inhibiție ale probelor asupra
*Porphyromonas gingivalis***

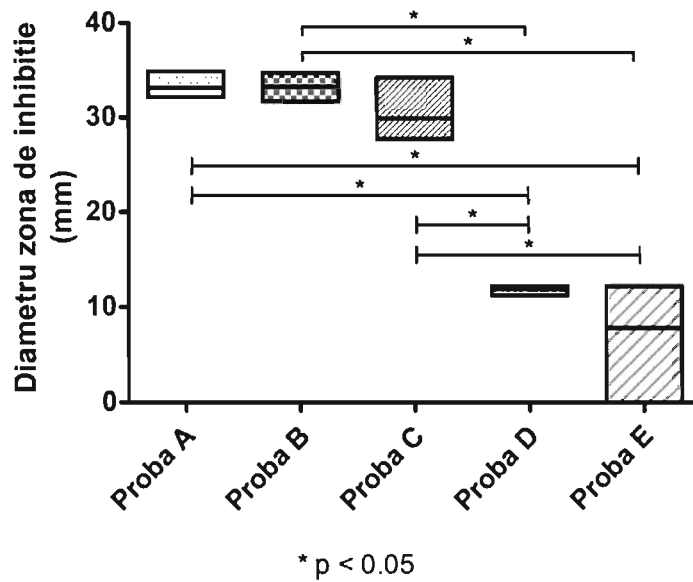


Figura 10a. Aspect clinic al firelor circumdentare la momentul aplicării.



Figura 10b. Aspect clinic al firelor circumdentare la 14 zile de la momentul aplicării.



Figura 11. Grafic comparativ între indicii gingivali identificați în primele două faze ale studiu

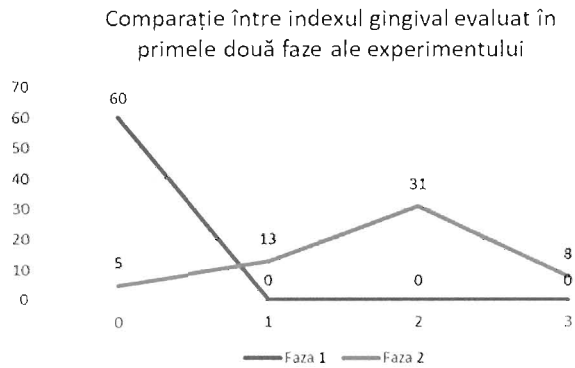


Figura 12. Grafic comparativ între mobilitățile dentare identificate în primele două faze ale studiului.

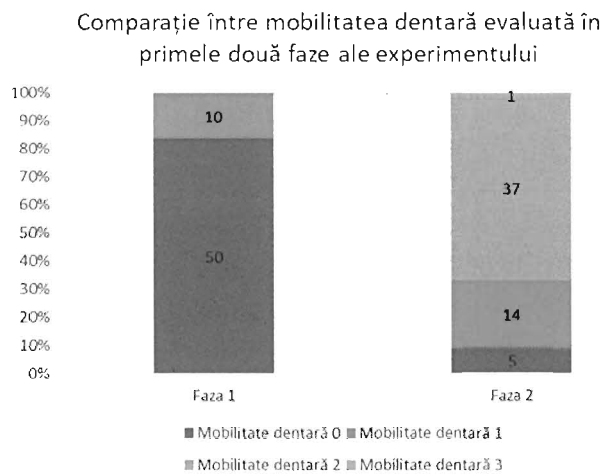


Figura 13. Aspectul afânat al materialului înainte de aplicarea sa în sulcus (a). Aplicarea la nivel sulcular a noului material obținut prin tehnica de electrospinning (b).

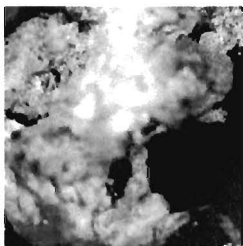


Figura 13a.



Figura 13b

Figura 14. Concentrația salivară a MMP-8 la cele patru loturi, în cele trei faze ale experimentului

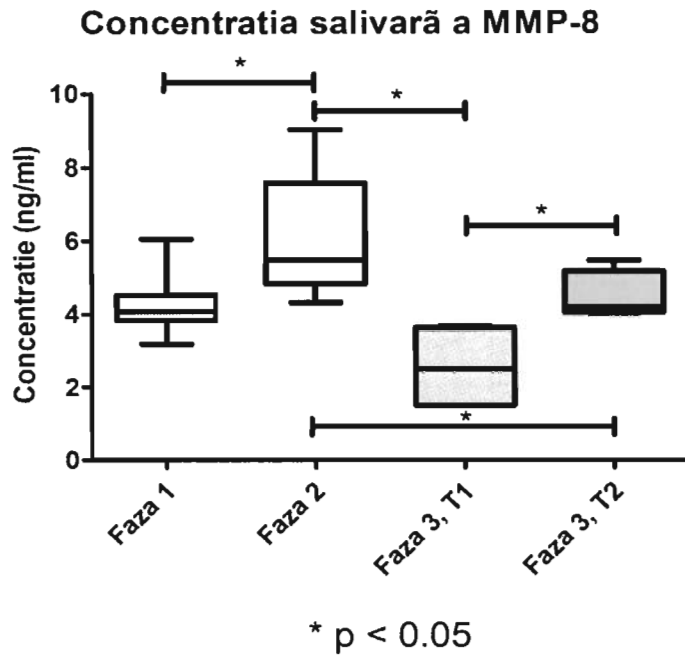


Figura 15. Concentrația plasmatică a IL-1 la cele patru loturi, în cele trei faze ale experimentului

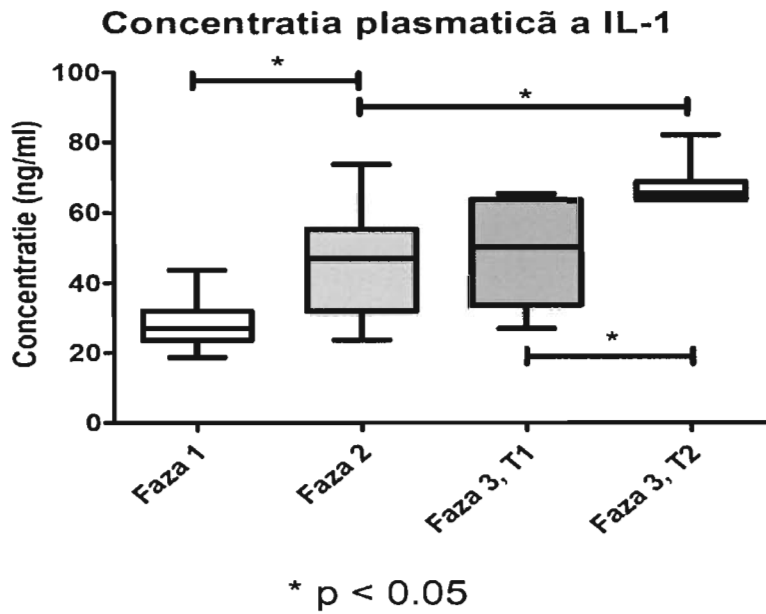


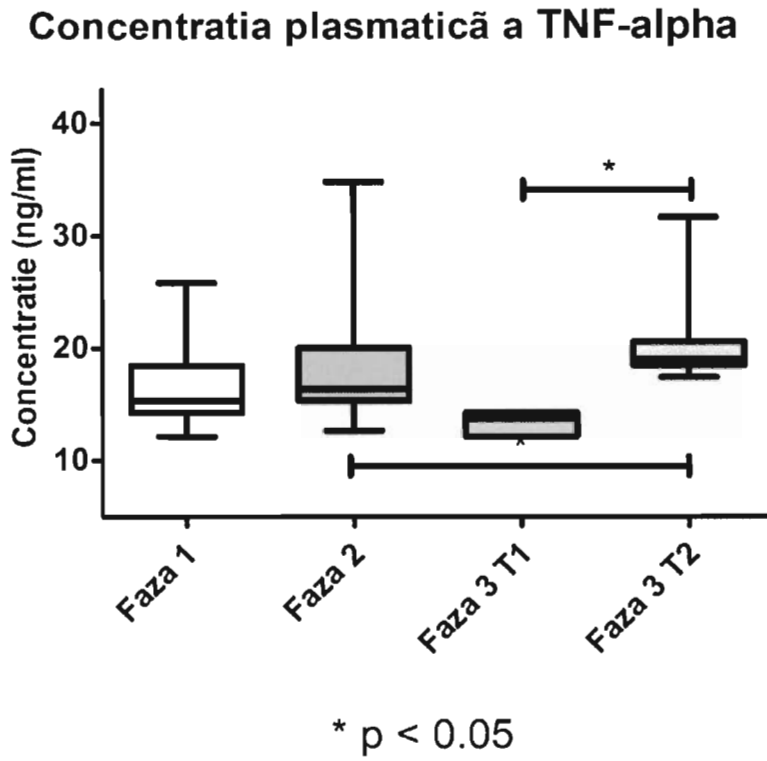
Figura 16. Concentrația plasmatică a TNF- α la cele patru loturi, în cele trei faze ale experimentului

Figura 17. Concentrația plasmatică a IL-6 la cele patru loturi, în cele trei faze ale experimentului

