
TEZĂ DE DOCTORAT

Studii asupra utilizării membranei cochilifere de ou în chirurgia maxilo-facială

Doctorand: **Horia Octavian Opreș**

Conducător de doctorat: Prof.dr. **Grigore Băciuț**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

1. Evoluția regenerării osoase ghidate

2. Regenerarea osoasă folosind membrane

2.1. Dezvoltarea și structura osului

2.1.1. Funcții

2.1.2. Tipuri de oase și organizarea structurală

2.1.3. Celule osoase

2.1.4. Formarea și mineralizarea matricei osoase

2.2. Modelarea și remodelarea oaselor

2.2.1. Aspecte structurale

2.2.2. Aspecte moleculare

2.3. Biologia regenerării osoase

2.3.1. Regenerare fiziologică versus regenerare reparatorie

2.3.2. Repararea defectelor alveolare

2.3.3. Regenerarea osoasă ghidată

2.3.4. Biomateriale utilizate pentru GBR

2.3.5. Vindecarea osoasă în defecte protejate de membrană fără adăugarea unui material de umplere osoasă

2.3.6. Vindecarea osoasă în defecte protejate de membrană cu adăugarea unui material

de umplere osoasă

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

1. Ipoteza de lucru și obiectivele

2. Metodologia generală

3. Studiul 1: Aplicațiile clinice ale hidroxiapatitei din coaja de ou

3.1. Introducere

3.2. Materiale și metode

3.3. Rezultate

3.4. Discuții

3.5. Concluzii

4. Studiul 2: Influența cojii de ou asupra regenerării osoase, în studiile preclinice *in vivo*

4.1. Introducere

4.2. Materiale și metode

4.3. Rezultate

4.4. Discuții

4.5. Concluzii

5. Studiul 3: Biocompatibilitatea și răspunsul histologic al membranei din coajă de ou în regenerarea osoasă ghidată

- 5.1. Introducere
- 5.2. Materiale și metode
- 5.3. Rezultate
- 5.4. Discuție
- 5.5. Concluzii

6. Studiul 4: Compararea membranelor din coajă de ou și pericard de origine animal pentru aplicații de regenerare osoasă ghidată

- 6.1. Introducere
- 6.2. Materiale și metode
- 6.3. Rezultate
- 6.4. Discuție
- 6.5. Concluzii

7. Concluzii generale

8. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

REFERINȚE

Cuvinte cheie: coajă de ou, membrană, bone regeneration, guided bone regeneration, mechanical properties.

INTRODUCERE

Implantele dentare reprezintă un tratament din ce în ce mai frecvent utilizat. Conceptul actual a fost stabilit încă din 1950 de către Brånemark în ceea ce privește osteointegrarea titanului la nivelul oaselor alveolare. Primul implant dentar de tip șurub numit și Ventplant a fost introdus în 1963. În urma unui Consens din 1978 de la Harvard, au fost elaborate criteriile de succes cu care se evaluează un implant dentar. Astfel s-a stabilit că prezența unui implant dentar și menținerea funcției timp de 5 ani reprezintă un succes terapeutic. În anii 1980 Brånemark a prezentat rezultatele cumulate în 30 de ani de experiență cu referire la ce numea atunci Sistemul Brånemark, cu aplicarea a 4-6 implanturi dentare interforaminal și încărcate protetic imediat. Acest concept a fost ulterior preluat și redenumit ca și "All-on-four" ¹. Linkow a popularizat încă din 1968 conceptul de implant dentar tip lamă pentru tratamentul edentației parțiale sau totale, cu precădere în cazurile în care oferta osoasă este deficitară ².

Primele grefe osoase au fost reprezentate de către grefele de creasta iliacă, costală sau calvarie. Acestea au fost utilizare cu precădere ca și grefă inlay sau onlay, pentru augmentări orizontale și verticale ³.

În prezent cercetarea în domeniul modificării membranelor vizează un răspuns favorabil al țesutului osos. Astfel se dorește sporirea activității antimicrobiene a produsului, eliberarea de compuși activi sau a unor factori de creștere ⁹.

Primul studiu conceput în această teză dorește să sintetizeze utilizarea produselor biologice derivate din coajă de ou în studii clinice. Astfel s-a investigat tipul de material folosit, rezultatele clinice determinate, dar și calitatea studiilor incluse.

În al doilea studiu, am cercetat importanța produselor biologice derivate din coajă de ou în utilizarea pe modelele de defecte osoase *in vivo*. Astfel s-au evaluat multiple biomateriale utilizate în diferite forme cu tehnici chirurgicale diferite.

În al treilea studiu s-a realizat un model animal pe șobolani Wistar în care s-a testat biocompatibilitatea unei noi membrane derivate din coajă de ou. În acest mod s-a testat pe model subcutanat și intramuscular pe un lot dat viabilitatea și reacția tisulară pentru produsul din membrană de coajă de ou.

Al patrulea studiu a testat aceeași membrană novatoare propusă derivată din coajă de ou în ceea ce privește proprietățile mecanice, mai specific tracțiunea. Morfologia de suprafață a fost evaluată histologic, cu microscopie electronică și cu microscopie atomică de forță. Aceste cercetări au fost efectuate comparativ cu o membrană derivată din pericard porcine.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Un volum osos este necesar pentru inserția implantelor dentare și osteointegrarea pe termen lung. Studiile clinice au arătat că implanturile lipsite de perete osos vestibular la momentul plasării prezintă o rată mai mare de complicații legate de țesuturile moi, ceea ce duce la un prognostic mai puțin favorabil pe termen lung. Pentru a aborda aceste neajunsuri, au fost dezvoltate tehnici chirurgicale pentru a augmenta osul restant al crestei alveolare, inclusiv augmentarea verticală a crestei, elevarea podelei sinusale, augmentarea laterală folosind grefe de tip onlay autogene și regenerarea osoasă ghidată (GBR) cu membrane de tip barieră.

GBR a fost dezvoltat inițial pentru regenerarea parodontală (regenerarea tisulară ghidată - GTR) și implică utilizarea membranelor pentru a crea o barieră fizică care separă diferite țesuturi și promovează osteogeneza. Introducerea membranelor din politetrafluoretilenă expandată (ePTFE) a devenit standard pentru procedurile GBR. Cu toate acestea, au fost observate neajunsuri precum colapsul membranei și augmentarea insuficientă a osului restant, ceea ce a dus la utilizarea concomitentă a membranelor ePTFE cu grefe osoase pentru rezultate mai bune.

În ciuda succesului membranelor ePTFE, proprietățile lor hidrofobe și necesitatea unei a doua intervenții chirurgicale pentru îndepărtarea lor au determinat dezvoltarea unei soluții cu membrane bioresorbabile. Membranele de colagen au apărut ca o alternativă pentru procedurile de GBR. Alături de selectarea membranei, alegerea materialului adecvat pentru augmentarea osoasă este determinantă pentru calitatea rezultatului. Osul autogene măcinat a fost inițial utilizat pentru a oferi suport mecanic membranelor.

Dezvoltarea tehnicilor de imagistică 3D, cum ar fi tomografia computerizată cu fascicul conic (CBCT), a facilitat o vizualizare radiografică mai bună, reducând expunerea la radiații. CBCT a devenit esențial pentru diagnosticare, analiza morfologică a defectelor osoase și evaluarea în dinamică a vindecării osoase. Înțelegerea caracteristicilor biologice ale grefelor osoase și ale substituenților osoși a condus la recunoașterea potențialului osteogenic excelent pentru grefa osoasă autogenă.

Introducerea implanturilor cu diametru îngust (NDI) realizate din aliaj Ti-15Zr în 2010, oferind o rezistență mai mare și un risc redus de fractură, a permis un protocol standard de plasare a implanturilor fără a fi nevoie de GBR în situații de creastă osoasă alveolară cu lățime redusă. Aceste progrese, inclusiv utilizarea grefelor compozite și a implanturilor cu diametru îngust, au rafinat tehnica GBR, reducând morbiditatea, costul și durata tratamentului.

Regenerarea osoasă cu ajutorul membranelor are un rol important pentru a restaura osul alveolar atât pentru rezultatele estetice, cât și pentru succesul pe termen lung al terapiei cu implant dentar. Există diferite opțiuni terapeutice pentru

îmbunătățirea formării osoase, inclusiv osteoinducția prin grefe osoase autogene sau factori de creștere, osteoconducția folosind grefe osoase autogene sau substituenți osoși ca matrice, transferul de celule stem sau celule progenitoare, osteogeneza prin alungire osoasă lentă direcționată și regenerarea osoasă ghidată (GBR) folosind membrane de barieră.

Indiferent de metoda utilizată, există un mecanism biologic fundamental care stă la baza vindecării osoase. Oasele au o capacitate unică de a vindeca fracturile sau defectele locale cu o organizare a țesuturilor comparabilă cu structura originală. Augmentarea osoasă adecvată sau tratamentul oricărui defect osos necesită o înțelegere a dezvoltării osoase și a morfogenezei la nivel celular și molecular.

Osul prezintă funcții multiple, precum suportul mecanic, mișcarea și locomoția, sprijinul dentar, protejarea encefalului, a măduvei spinării și organelor, găzduirea măduvei osoase ca sursă de celule hematopoietice și homeostazia calciului. Există mai multe tipuri de oase (lungi și plate), iar organizarea lor structurală are la bază orientarea fibrelor de collagen.

Celulele osoase sunt reprezentate de mai multe celule precum osteoblaste, osteocite și osteoclaste și prezintă multiple roluri în formarea, întreținerea și repararea osoasă. Osteoblastele sunt responsabile pentru sinteza și mineralizarea matricei osoase, în timp ce osteocitele joacă un rol crucial în metabolismul osos. Osteoclastele sunt implicate în resorbția osoasă, iar celulele periostale sunt considerate osteoblaste inactice care acoperă suprafețele osoase.

Formarea și mineralizarea matricei osoase este produsă de osteoblaste care sintetizează osteoidul, un amestec de macromolecule care formează matricea osoasă. Remodelarea fiziologică este un proces continuu al osului, care explică diferențele dintre remodelarea osoasă corticală și trabeculară. Aspectele moleculare ale remodelării osoase sunt mediate de echilibrul delicat dintre formarea și resorbția osoasă care implică diferite tipuri de celule, citokine și factori de creștere.

Reglarea remodelării osoase este efectuată de mulți factori care aparțin metabolismului osos și sistemului imunitar. Aceasta se poate modifica și terapeutic prin utilizarea denosumabului pentru a bloca semnalizarea RANKL pentru afecțiuni precum osteoporoza și metastazele osoase.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Studiul 1: Aplicațiile clinice ale hidroxiapatitei derivate din coaja de ou

Acest studiu este o revizuire sistematică care își propune să evalueze eficiența clinică a cojii de ou ca material de substituție osoasă în regenerarea osoasă ghidată din chirurgia orală. Revizuirea utilizează ghidul PRISMA și include o rezultatele căutării efectuate până în februarie 2020 în cinci baze de date, cu accent pe utilizarea cojilor de ouă în îmbunătățirea regenerării osoase în defectele osoase alveolare.

Criteriile de includere au fost de reprezentate de vârsta participanților să aibă cel puțin 18 ani, fără boli sistemice, care au nevoie de intervenții de regenerare osoasă și nefumători. Au fost luate în considerare studii clinice în care coaja de ou a fost utilizată comparativ cu o intervenție standard pentru regenerarea osoasă alveolară. Rezultatele primare măsurate au inclus modificări ale dimensiunilor și densității crestei alveolare după augmentare, timpului de vindecare, complicații chirurgicale, modificări osoase marginale, rezultate raportate de pacient și efecte adverse.

Căutarea inițială a rezultat 840 de articole, procesul de screening a condus la includerea doar a cinci studii clinice. Aceste studii au prezentat un risc critic până la grav de bias. Un total de 74 de pacienți și 88 de situsuri operatorii au fost incluse în cercetare. Evaluarea clinică și radiologică a indicat vindecarea completă pe parcursul urmăririi, cu dovezi semnificative statistic de formare de ou nou în diferite modele de defect osos alveolar, cum ar fi conservarea alveolei postextractionale, grefarea după extracția molarului al treilea și grefarea după chistectomie. În plus, comparația cu hidroxiapatita sintetică a arătat caracteristici similare de vindecare.

Revizuirea sistematică concluzionează că, în limitele studiilor incluse deși prezintă risc de bias ridicat, cojile de ouă pot fi utilizate în condiții de siguranță și eficiență în procedurile GBR. Cu toate acestea, sunt necesare cercetări prospective de calitate pentru a evalua pe deplin potențialul acestui material.

Studiul 2: Influența cojii de ou asupra regenerării osoase, în studiile preclinice *in vivo*

Acest studiu analizează potențialul regenerativ al cojii de ou ca material pentru regenerarea osoasă. După ce s-a efectuat căutarea prin cinci baze de date, autorii au identificat și analizat 20 de studii preclinice eligibile axate pe utilizarea cojii de ouă ca material de greaf pentru defectele osoase la modelele animale.

Principalele constatări ale revizuirii includ:

1. Cojile de ouă sunt biocompatibile și demonstrează proprietăți osteoconductive, ceea ce înseamnă că susțin creșterea țesutului osos nou de-a lungul suprafețelor lor.

2. Grefele de coajă de ou pot promova formarea osoasă nouă, cu rezultate similare cu alte materiale comerciale de grefă, cum ar fi Bio-Oss și matricea osoasă liofilizată demineralizată.

3. Se folosesc diferite metode pentru prepararea materialelor de grefă din coajă de ou, iar acestea pot fi combinate cu alte substanțe pentru a-și spori proprietățile.

4. Studiile au folosit fie șobolani Wistar, șobolani Sprague-Dawley sau iepuri din Noua Zeelandă și au utilizat defecte osoase de dimensiuni critice, calvaria fiind cel mai des utilizată, ca modele pentru evaluarea formării osoase noi.

5. Tehnicile de măsurare a formării osoase noi au inclus analiza histomorfometrică, tehnicile radiografice (de exemplu, micro-CT, radiografii standard) și analiza biomaterialului rezidual.

În pofida rezultatelor promițătoare, revizuirea sistematică evidențiază eterogenitatea procedurilor, modelelor animale și metodelor de evaluare în studiile incluse, neputând-se efectua o meta-analiză. În plus, riscul de bias a fost evaluat utilizând instrumentul SYRCLE, iar calitatea studiilor a fost evaluată pe baza ghidurilor ARRIVE.

În concluzie, articolul subliniază faptul că, în timp ce coaja de ou este un biomaterial promițător pentru procedurile de grefă osoasă, sunt necesare cercetări suplimentare pentru standardizarea metodelor și stabilirea eficacității sale clinice.

Studiul 3: Biocompatibilitatea și răspunsul histologic al membranei din coajă de ou în regenerarea osoasă ghidată

Studiul a investigat posibilitatea utilizării membranei de coajă de ou (ESM) ca biomaterial pentru regenerarea osoasă ghidată a osului alveolar. ESM, un produs rezidual bogat în collagen, a fost evaluat pentru biocompatibilitatea și răspunsul histologic folosind un model subcutanat și intramuscular pe 12 șobolani Wistar.

Principalele rezultate ale studiului includ:

- ESM și-a menținut integritatea structurală și a indus un răspuns celular moderat, prezentând în același timp o degradare lentă

- ESM nu generează o reacție a corpului străin, ceea ce susține utilizarea sa ca o barieră ocluzivă, dar nu ca o membrană de separare datorită lipsei sale de organizare a fibrelor de collagen care să nu permită migrarea celulelor.

- Reticularea poate îmbunătăți proprietățile ESM pentru a crește stabilitatea și a reduce antigenicitatea, sporind astfel potențialul său ca produs GBR.

Cercetarea și-a propus să exploreze utilizarea ESM ca membrană de separare pentru GBR. Analiza histologică a ESM implantat la șobolani a arătat că, în timp ce poate acționa ca o membrană protectoare, nu poate funcționa ca membrană separatoare. Organismul răspunde la ESM prin încapsulare și degradare lentă fără respingere imună, făcând membrana un vehicul potențial pentru substanțe necesare a-i îmbunătăți proprietățile. Cu toate acestea, sunt necesare modificări precum ar fi reticularea pentru a utiliza mai bine ESM ca biomaterial de GBR.

Studiul 4: Compararea membranelor din coajă de ou și pericard de origine animal pentru aplicații de regenerare osoasă ghidată

Această lucrare compară utilizarea membranelor cu coajă de ou și a membranelor din pericard porcine pentru aplicații în regenerarea tisulară ghidată, mai exact proprietățile lor mecanice și microstructura. Au fost efectuate multiple testări, inclusiv testarea mecanică a rezistenței la tracțiune, analiza la microscopul electronic de scanare și microscopia cu forță atomică (AFM).

Rezultatele arată că membrana din coajă de ou are o rezistență mecanică bună, dar aranjamentul său aleatoriu al fibrelor de colagen nu definește ochiurile regulate, ceea ce nu o face ideală ca barieră de separare în GBR, deoarece permite celulelor să treacă. În schimb, membrana din pericard porcine are o structură intercalată controlată de fibre uniforme de colagen, oferind o suprafață mai netedă și o funcție de barieră mai puternică.

Rezultatele histopatologice indică faptul că membrana cojii de ou rămâne intactă după procesarea histologică și nu se modifică atunci când intră în contact cu fluidele corporale. Analiza SEM oferă o comparație detaliată a microstructurilor celor două materiale. Analiza AFM relevă diferențe de rugozitate și detalii microstructurale între membrane.

Testarea rezistenței la tracțiune indică faptul că membrana cojii de ou prezintă o rezistență semnificativă la tracțiune atunci când este umedă și că această rezistență scade atunci când membrana este uscată din cauza fragilității coeziunii mediate de glicoproteine. Membrana din pericard porcine prezintă un comportament mecanic consistent datorită fasciculelor de colagen bine întrețesute.

Studiul concluzionează că membrana cojii de ou este biocompatibilă, resorbabilă și nu induce un răspuns de corp străin și are potențial de vehicul pentru alte substanțe care să îi îmbunătățească proprietățile. Cu toate acestea, este esențial să se cercetereze clinic potențialul membranei in vivo cu un model de defect osos și să se investigheze

proceele de reticulare care pot îmbunătăți funcțiile sale mecanice și de barieră. Cercetările ulterioare ar putea face membranele din coajă de ouă un produs viabil pentru GBR. Există anumite limitări, cum ar fi absența unei imagini histologice sau histomorfometrice dinamice pe un model de defect osos alveolar.

Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

Teza de doctorat cuprinde cinci studii care aduc în prim plan una din cele mai importante teme din domeniul regenerării osoase și tisulare ghidate, mai precis dezvoltarea unui biomaterial nou, cu potențial osteogenic, economic și cu aplicabilitate clinică ridicată.

Perspectivile actuale ale utilizării clinice ale membranelor și a cojilor de ou ca membrană de regenerare ghidată sau material de umplere a defectelor sunt reale și au fost indexate în primele două studii din această teză. Astfel putem vedea că există publicații distincte, deși cu unele disfuncționalități în ceea ce privește designul protocolului de lucru, care au utilizat pe model uman astfel de materiale sau derivate. Totodată există cercetări multiple *in vivo* în legătură cu posibilele efecte benefice și forme de utilizare ale produselor. Studiile și rezultatele lor sunt promițătoare în sensul în care este demonstrată ușurința lor în manipulare, biocompatibilitatea precum și rezultatele similare pentru anumite modele de defecte pe animale cu produsele existente în uzul curent.

Al treilea studiu experimental și-a propus să evalueze o membrană inovatoare produsă din coajă de ou, privind biocompatibilitatea și reacția ei tisulară. Astfel, pe un model animal pe șobolan Wistar s-a testat ușurința în manipulare a membranei și dinamica resorbției acesteia. Am evaluat secvențiat și seriat analizele histologice cercetând degradarea acesteia până la 8 săptămâni. Am demonstrat astfel că nu produce reacție de corp străin și că are capacitatea să fie utilizată în regenerarea osoasă sau tisulară ghidată cu perspective reale de succes.

Pentru a putea completa evaluarea membranei propuse, am dorit să efectuăm studii mecanice și de suprafață folosind microscopia electronică și atomică (SEM și AFM). Astfel membrana a fost comparată cu una disponibilă pe piață pentru a analiza similitudinea între cele două și a vedea unde ar putea suferi îmbunătățiri. Au rezultat astfel studii ce demonstrează unicitatea membranei ca viitor vehicul de regenerare. Totodată colectivul a propus continuarea cercetărilor cu o posibilitate de reticulare a membranei și utilizarea ei într-un model animal specific de regenerare osoasă ghidată.

Această teză cuprinde mai multe domenii de activitate multidisciplinară care au făcut posibilă această cercetare cu aducerea unui subiect de interes în prim-planul cercetării din România și în lume.

PhD THESIS

Studies on the use of the eggshell membrane in maxillofacial surgery

Doctoral student: **Horia Octavian Opreș**

Scientific adviser: Prof.dr. **Grigore Băciuț**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION

CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

1. Evolution of guided bone regeneration

2. Bone regeneration using membranes

2.1. Development and structure of bone

2.1.1. Functions

2.1.2. Bone types and structural organisation

2.1.3. Bone cells

2.1.4. Formation and mineralisation of the bone matrix

2.2. Bone shaping and remodelling

2.2.1. Structural aspects

2.2.2. Molecular aspects

2.3. Biology of bone regeneration

2.3.1. Physiological versus reparative regeneration

2.3.2. Augmentation of alveolar defects

2.3.3. Guided bone regeneration

2.3.4. Biomaterials used for GBR

2.3.5. Bone healing in membrane-protected defects without addition of bone filler

2.3.6. Bone healing in membrane-protected defects with addition of bone filler

PERSONAL CONTRIBUTION

1. Working hypothesis and objectives

2. General methodology

3. Study 1: Clinical applications of eggshell hydroxyapatite

3.1. Introduction

3.2. Materials and methods

3.3. Results

3.4. Discussion

3.5. Conclusions

4. Study 2: Influence of eggshells on bone regeneration in in vivo

preclinical studies

4.1. Introduction

4.2. Materials and methods

4.3. Results

4.4. Discussion

4.5. Conclusions

5. Study 3: Biocompatibility and histological response of eggshell membrane in guided bone regeneration

5.1. Introduction

5.2. Materials and methods

5.3. Results

5.4. Discussion

5.5. Conclusions

6. Study 4: Comparison of eggshell and pericardium membranes of animal origin for guided bone regeneration applications

6.1. Introduction

6.2. Materials and methods

6.3. Results

6.4. Discussion

6.5. Conclusions

7. General conclusions

8. Originality and innovative contributions of the thesis

REFERENCES

Keywords: eggshell, membrane, bone regeneration, guided bone regeneration, mechanical proprieties.

INTRODUCTION

Dental implants are an increasingly common dental rehabilitation treatment tool. The current concept was established as early as 1950 by Brånemark regarding the osseointegration of titanium in the alveolar bones. The first screw-type dental implant, also called Ventplant, was introduced in 1963. Following a 1978 Harvard Consensus, the success criteria for evaluating a dental implant were developed. Thus, it was established that the presence of a dental implant and the maintenance of function for 5 years is considered a therapeutic success. In the 1980s Brånemark presented the results accumulated in 30 years of experience with reference to what it then called the Brånemark System, with the application of 4-6 dental implants interforaminal and prosthetics loaded immediately. This concept was later taken over and renamed as "All-on-four". Linkow has popularized since 1968 the concept of a blade-type dental implant for the treatment of partial or total edentulation, especially in cases where bone supply is deficient. The first bone grafts were represented by iliac crest, costal or calvarial grafts. They were mainly used as an inlay or onlay graft for horizontal and vertical augmentations.

Currently, research in the field of membrane modification is aimed to produce a favorable response of the bone. This is intended to increase the antimicrobial activity of the product, release of active compounds or growth factors.

The first study conceived in this thesis aims to synthesize the use of biological products derived from eggshells in clinical trials. Thus, the type of material used, the clinical results were determined, but also the quality of the included studies were investigated.

In the second study, we investigated the importance of eggshell-derived biological products in use on bone defect models *in vivo*. Thus, multiple biomaterials used in different forms with different surgical techniques were evaluated.

In the third study, an animal model was conducted on Wistar rats in which the biocompatibility of a new eggshell-derived membrane was tested. In this way, the viability and tissue reaction for the eggshell membrane product was tested on a subcutaneous and intramuscular model.

The fourth study tested the same proposed innovative eggshell-derived membrane for mechanical properties, specifically mechanical resistance to tensile strength. Surface morphology was evaluated histologically, with electron microscopy and atomic force microscopy. This research was conducted in comparison with a membrane derived from porcine pericardium.

CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

Sufficient healthy bone volume is mandatory for the success of dental implants. Clinical studies have shown that implants lacking buccal osseous walls at the time of placement exhibit a higher rate of complications related to soft tissues, leading to a less favorable long-term prognosis. To address these challenges, surgical techniques have been developed to augment alveolar crest bone, including vertical ridge augmentation, sinus lift, lateral augmentation using autogenous onlay grafts, and guided bone regeneration (GBR) with barrier membranes.

GBR, initially developed for periodontal regeneration (guided tissue regeneration - GTR), involved using membranes to create a physical barrier that separates different tissues and promotes osteogenesis. The introduction of expanded polytetrafluoroethylene (ePTFE) membranes became the standard for GBR procedures. However, complications such as membrane collapse and insufficient bone formation were observed, leading to the recommendation of combining ePTFE membranes with bone grafts for better results.

Despite the success of ePTFE membranes, their hydrophobic properties, and the need for a second surgery to remove these non-resorbable membranes prompted the exploration of bioresorbable materials. Collagen membranes emerged as a common choice in daily practice for GBR procedures. Alongside membrane selection, choosing the appropriate bone augmentation material is crucial for regenerative outcomes. Autogenous bone chips were initially used to provide mechanical support to membranes, and later studies demonstrated different biological characteristics of bone substitute materials.

The development of 3D imaging techniques, such as cone-beam computed tomography (CBCT), facilitated better radiographic visualization, reducing radiation exposure. CBCT has become essential for diagnostics, morphological analysis of bone defects, and dynamic evaluation of bone augmentations. The understanding of biological characteristics of bone grafts and substitutes led to the recognition of the excellent osteogenic potential of the autogenous bone chips and the slower bone formation in alloplastic substitutes.

The introduction of narrow-diameter implants (NDIs) made from Ti-15Zr alloy in 2010, offering higher strength and reduced fracture risk, allowed for a standard implant placement protocol without the need for GBR in narrow alveolar crests. These advancements, including the use of composite grafts and narrow-diameter implants, have refined the GBR technique, reducing patient morbidity and costs.

Bone regeneration using membranes requires viable bone for both aesthetic outcomes and the long-term success of dental implant therapy. Various therapeutic options for improving bone formation exist, including osteoinduction through

autogenous bone grafts or growth factors, osteoconduction using autogenous bone grafts or bone substitutes as matrices, stem cell or progenitor cell transfer, osteogenesis through directed slow bone elongation, and guided bone regeneration (GBR) using barrier membranes.

Regardless of the method used, there is a fundamental biological mechanism underlying bone healing. Bones have a unique ability to heal fractures or local defects with tissue organization comparable to the original structure. Adequate bone augmentation or treatment of any bone defect requires an understanding of bone development and morphogenesis at the cellular and molecular levels.

There are multiple functions of bones, including mechanical support, movement and locomotion, support for teeth required for food processing, protection of the brain, spinal cord, and organs, housing bone marrow as a source of hematopoietic cells, and calcium homeostasis. There are two types of bones (long and flat) and their structural organization is based on collagen fiber orientation.

The bone cells have several roles and their main representatives are osteoblasts, osteocytes, osteoclasts, and bone lining cells which are crucial for bone formation, maintenance, and repair. Osteoblasts are responsible for synthesizing and mineralizing the bone matrix, while osteocytes play a crucial role in bone metabolism. Osteoclasts are involved in bone resorption, and bone lining cells are considered inactive osteoblasts covering the bone surfaces.

Osteoblasts synthesize the osteoid, a mix of macromolecules that form the bone matrix. There is also a continuous physiological remodeling of bone, explaining the differences between cortical and trabecular bone remodeling. The molecular aspects of bone remodeling are very important, with the emphasis on the delicate balance between bone formation and resorption involving various cell types, cytokines, and growth factors.

PERSONAL CONTRIBUTIONS

Study 1: Clinical applications of eggshell-derived hydroxyapatite

This study is a systematic review that aims to evaluate the clinical performance of eggshell as a bone substitute material in guided bone regeneration in oral surgery. The review follows the PRISMA guidelines and includes a search up to February 2020 across five databases, with a focus on the use of eggshells in enhancing bone regeneration in alveolar bone defects.

The inclusion criteria required the participants to be at least 18 years old, with no systemic diseases, in need of bone regeneration interventions, and non-smokers. Controlled clinical trials where eggshell was used for any standard intervention for oral and bone regeneration were considered. The primary outcomes measured included changes in alveolar ridge dimensions, density, and healing time, along with any surgical complications, marginal bone changes, patient-reported outcomes, and adverse effects.

After an initial yield of 840 articles, the screening process led to the inclusion of five clinical studies. These studies displayed a critical to serious risk of bias and included a total of 74 patients and 88 intervention sites. The clinical and radiological evaluations indicated complete healing during follow-ups, with statistically significant evidence of new bone formation in different surgical models such as socket preservation, grafting after third molar extraction, and cystic/apicectomy grafting. Additionally, a comparison with synthetic hydroxyapatite showed similar healing characteristics.

The review concludes that within the limitations of the included studies, eggshells can be safely and efficiently used in GBR procedures. However, the authors emphasize the need for further research to fully evaluate the potential of this material.

Study 2: Influence of eggshells on bone regeneration in in vivo preclinical studies

This article reviews the potential of avian eggshell as a material for bone regeneration. After searching through five databases, the authors identified and analyzed 20 eligible preclinical studies focused on using eggshell as a grafting material for bone defects in animal models.

Key findings from the review include:

1. Eggshells are biocompatible and demonstrate osteoconductive properties, meaning they support the growth of new bone tissue along their surfaces.
2. Eggshell grafts can promote new bone formation, with results similar to other commercial graft materials like Bio-Oss and demineralized freeze-dried bone matrix.
3. Various methods are used to prepare eggshell grafting materials, and these can be combined with other substances to enhance their properties.
4. The studies typically used either Wistar rats, Sprague-Dawley rats, or New Zealand rabbits and utilized critical-sized bone defects, primarily in the calvaria, as models for assessing new bone formation.
5. Techniques for measuring new bone formation included histomorphometric analysis, radiographic techniques (e.g., micro-CT, standard radiographs), and analysis of residual biomaterial.

Despite promising results, the review highlights heterogeneity in procedures, animal models, and assessment methods across the included studies, preventing a meta-analysis. Additionally, the risk of bias was assessed using the SYRCLE tool, and the quality of the studies was evaluated based on the ARRIVE guidelines.

In conclusion, the article emphasizes that while eggshell is a promising biomaterial for bone grafting procedures, further research is necessary to standardize methods and establish its clinical efficacy.

Study 3: Biocompatibility and histological response of eggshell membrane in guided bone regeneration

The study investigated the use of eggshell membrane (ESM) as a biomaterial for dental implant-guided bone regeneration. The ESM, a waste product rich in collagen, was evaluated for its biocompatibility and histological response using a rat model. Key findings from the study include:

- ESM maintained structural integrity and induced a moderate cellular response while exhibiting slow degradation - suggesting potential biocompatibility.
- The ESM does not generate a foreign body reaction, which supports its use as an occlusive barrier, but not as a separation membrane due to its lack of organized collagen arrangement allowing for cell migration.
- Crosslinking may improve ESM properties to increase stability and decrease antigenicity, thus enhancing its potential as a GBR product.
- The study encourages further research on ESM processing steps and on using crosslinking to overcome its current limitations.

The research aimed to explore the suitability of ESM as a separating membrane for GBR in dental implants. Histological analysis of implanted ESM in rats revealed that while ESM can act as a protective membrane, its irregular collagen fiber arrangement hinders its function as a separating membrane. The body responds to ESM by encapsulation and slow degradation without severe immune rejection, making it a potential vehicle for substances to enhance its properties. However, improvements such as crosslinking are needed to better utilize ESM as a reliable GBR biomaterial.

Study 4: Comparison of eggshell and pericardium membranes of animal origin for guided bone regeneration applications

This paper compares the use of eggshell membrane and porcine pericardium membranes for applications in guided bone and tissue regeneration, particularly for their mechanical properties and structural suitability. Extensive testing was performed, including mechanical tensile testing, Scanning Electron Microscopy analysis, and Atomic Force Microscopy.

The results show that eggshell membrane has good mechanical strength, but its random arrangement of collagen fibers doesn't define regular meshes, making it not ideal as a separating barrier in GBR since it allows cells to pass through. In contrast, the porcine pericardium membrane has a controlled interlaced structure of uniform collagen fibers, providing a smoother surface and a stronger barrier function.

Histopathological results indicate that the eggshell membrane remains intact following histological processing and doesn't alter when in contact with bodily fluids. The SEM analysis provides a detailed comparison of the two materials' microstructures. The AFM analysis reveals differences in roughness and microstructural detail between the membranes.

Tensile strength testing indicates that the eggshell membrane exhibits significant tensile strength when wet and that this strength decreases when the membrane is dry due to the fragility of the glycoprotein-mediated cohesion. The porcine pericardium membrane displays consistent mechanical behavior due to well-interlaced collagen fascicles.

The study concludes that the eggshell membrane is biocompatible, resorbable, and doesn't induce a foreign body response, and has potential as a vehicle for other substances to enhance its properties. However, it is essential to explore the membrane's potential in vivo with a bone defect model and investigate cross-linking processes that may improve its mechanical and barrier functions. Further research could make the eggshell membranes a viable GBR product. The paper acknowledges that there are limitations, like the absence of a dynamic histologic or histomorphometry for the study, and it calls for future research to fully evaluate these membranes.

Originality and innovative contributions of the thesis

This doctoral thesis includes five studies that bring to the forefront one of the most important topics in the field of guided bone and tissue regeneration, more precisely the development of a new biomaterial, with osteogenic, economic potential and high clinical applicability.

Current prospects of clinical use of membranes and eggshells as guided regeneration membrane or defect filler are real and were reviewed in the first two studies in this thesis. Thus, we can see that there are distinct publications, although with some limitations in terms of the design of the working protocol. At the same time, there is multiple *in vivo* research on the possible beneficial effects and forms of use of the products. The studies and their results are promising because of their ease of handling, biocompatibility and similar results for certain animal defect models with existing products in common use are demonstrated.

The third experimental study aimed to evaluate an innovative eggshell membrane on its biocompatibility and tissue response. Thus, in an animal model on Wistar rats, the ease of handling of the membrane and the dynamics of its resorption were tested. We evaluated the sequencing and serial histological analyzes looking at its degradation up to 8 weeks. We have thus demonstrated that it does not produce a foreign body reaction and that it can be used in guided bone or tissue regeneration with real prospects of success.

To be able to complete the evaluation of the proposed membrane, we wanted to perform mechanical and surface studies using electron and atomic microscopy (SEM and AFM). Thus, the membrane was compared to one available on the market to analyze the similarity between the two and see where it could undergo improvements. This resulted in studies demonstrating the uniqueness of the membrane as a future regeneration vehicle. At the same time, the team proposed to continue the research with a possibility of membrane crosslinking and its use in a specific animal model of guided bone regeneration.

This thesis encompasses several areas of multidisciplinary activity that have made this research possible by bringing a topic of interest to the forefront of research in Romania and worldwide.