
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Utilizarea nanotehnologiei în chirurgia oral reconstructiv

Doctorand **Liana Cri an**

Conduc tor de doctorat **Prof. Dr. Grigore B ciu**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CLUJ-NAPOCA 2015

CUPRINS

INTRODUCERE	15
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	
1. Modalități de obținere a unor materiale compozite prin procedee nanotehnologice	19
1.1. Modalități de obținere a unor materiale compozite pe bază de nanotuburi de carbon	19
1.1.1. Prepararea compozitelor de tip nanotuburi de carbon/ polimer	20
1.1.1.1. Metoda prin suspensie	20
1.1.1.2. Prelucrarea prin topire	21
1.1.1.3. Polimerizarea in situ	22
1.1.1.4. Efectul nanotuburilor pe structurile de polimer	23
1.1.2. Prepararea compozitelor de tip nanotuburi de carbon/ ceramici	23
1.1.3. Prepararea compozitelor de tip nanotuburi de carbon/ carbon	25
1.1.4. Prepararea compozitelor de tip nanotuburi de carbon/ metal	26
1.1.5. Dezbateri comparative și remarci asupra finalității cercetărilor	26
1.2. Modalități de obținere a unor materiale compozite pe bază de grafene	27
1.2.1. Modalități de obținere a grafenelor	28
1.2.1.1. Exfolierea mecanică	28
1.2.1.2. Sinteza chimică	28
1.2.1.3. Depunerea chimică de vapori (CVD)	29
1.2.2. Prepararea catalizatorilor Au _x /MgO și a nanocompozitelor pe bază de grafene și aur (Gr-Au-x)	29
1.2.3. Prepararea materialelor nanocompozite pe baza de Au/Ha @ grafene	31
2. Considerații asupra osteogenezei prin inginerie tisulară. Biocompatibilitatea celulelor osteoprogenitoare cu materiale compozite obținute prin procedee nanotehnologice	33
2.1. Mecanisme de reglare a dezvoltării și diferențierii osteoblastelor	34
2.1.1. Factorii de creștere	34
2.1.2. Citokinele	35
2.1.3. Sistemul endocrin	35
2.1.4. Moleculele de adeziune	35
2.2. Osteoblastele, osteocitele și procesul de osteogeneză	36
2.3. Markerii moleculari ai celulelor osteoblastice	37
2.4. Recoltarea, izolarea și obținerea culturii primare de osteoblaste umane	39
2.5. Efectele fenomenului de adeziune celulară în biologia osteoblastului	40
2.6. Fenomenul de adeziune celulară la nivelul țesutului osos și la nivelul substratelor matriceale artificiale	42
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	
Ipoteza de lucru/obiective	47
3. Studiul 1 - Determinarea experimentală a biocompatibilității, a fenomenelor de adeziune și proliferare a osteoblastelor la suprafața biomaterialelor nanostructurate	49
3.1. Introducere	49
3.2. Ipoteza de lucru/obiective	50
3.3. Material și metodă	51
3.3.1. Prepararea materialelor compozite pe bază de aur (Au), hidroxiapatită (HA) și grafene (Au/HA/ grafene)	51
3.3.2. Caracterizarea materialelor compozite pe bază de aur (Au), hidroxiapatită (HA) și grafene (Au/HA/ grafene)	52
3.3.3. Prepararea substraturilor	52

3.3.4. Culturile de celule	53
3.3.5. Evaluarea proliferării și viabilității celulare cu diacetat de fluoresceină (FDA)	54
3.3.6. Colorația imunocitochimică	55
3.3.7. Analiza statistică	55
3.4. Rezultate	56
3.4.1. Caracterizarea materialelor compozite pe bază de grafene + nanoparticule de aur (GNPs) + hidroxiapatită (HA)	56
3.4.2. Testarea citotoxicității soluțiilor coloidale a materialelor compozite asupra osteoblastelor	58
3.4.3. Efectele substraturilor compozite asupra adeziunii, viabilității și proliferării osteoblastelor	61
3.4.4. Colorarea imunocitochimică. Influența substratului asupra procesului de diferențiere al osteoblastelor	64
3.5. Discuții	66
3.6. Concluzii	71
4. Studiul 2 - Studiu experimental asupra modificărilor produse de radiația laser la nivelul unor substraturi compozite nanostructurate	73
4.1. Introducere	73
4.2. Ipoteza de lucru/obiective	74
4.3. Material și metodă	74
4.3.1. Prepararea și caracterizarea materialelor compozite nanostructurate	74
4.3.2. Prepararea substraturilor pe bază de materiale compozite nanostructurate	75
4.3.3. Procedura de iradiere laser a substraturilor pe bază de materiale compozite nanostructurate	76
4.4. Rezultate	77
4.5. Discuții	81
4.6. Concluzii	83
5. Studiul 3. Efectele radiației LASER asupra osteoblastelor umane cultivate pe substraturi de materiale compozite nanostructurate	85
5.1. Introducere	85
5.2. Ipoteza de lucru/obiective	86
5.3. Material și metodă	87
5.3.1. Prepararea substraturilor de materiale compozite nanostructurate	87
5.3.2. Culturile de celule	87
5.3.3. Procedura de iradiere Laser a celulelor osteoblaste umane cultivate pe substraturi	89
5.3.4. Teste de evaluare a proliferării și viabilității celulare	93
5.3.4.1. Testul MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide)	93
5.3.4.2. Testul FDA (Diacetat de Fluoresceină)	94
5.3.5. Analiza statistică	94
5.4. Rezultate	94
5.5. Discuții	100
5.6. Concluzii	102
6. Concluzii generale	103
7. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	105

CUVINTE CHEIE: grafene, nanoparticule de aur, hidroxiapatită, osteoblaste umane, biocompatibilitate, iradiere laser, nanostructuri, substraturi compozite, spectroscopie Raman.

INTRODUCERE

Dezvoltarea la nivel mondial a materialelor compozite este impulsionată de evoluția în domeniul “nanotehnologiilor” care s-a impus în ultima perioadă de timp ca domeniul de cea mai mare actualitate, cu cea mai mare dinamică și cu un impact major asupra industriei și societății pentru următoarele decenii.

Au existat în permanență preocupări în domeniul medical de a înlocui elemente osoase deteriorate din corpul uman cu diverse materiale care să fie acceptate în țesutul uman (biocompatibile) cu integrare perfectă astfel încât în zona interfeței material-țesut osos să aibă loc aceleași fenomene ca în cazul fracturilor la interfața os-os. Progresele majore din diverse domenii medicale ale ultimilor ani (chirurgie cardio-vasculară, oftalmologie, chirurgie reparatorie, medicină dentară) demonstrează că medicina își poate depăși limitele numai cu ajutorul biotehnologiilor.

Defectele osoase ale scheletului reprezintă o gravă problemă de sănătate publică prin tulburările pe care le produc în organism. Metodologia reconstrucției osoase a cunoscut o serie de succese în ultimii ani, odată cu progresele înregistrate în domeniul biologiei celulare și moleculare. Diferite tipuri de transplantate osoase sunt utilizate tot mai mult pe plan internațional în chirurgia ortopedică, chirurgia maxilo-facială, dento-alveolară și parodontală pentru plastia defectelor osoase. Pe plan național există preocupări intense de cercetare în scopul decelării și implementării unui biomaterial cât mai avantajos de reconstrucție osoasă, colectivul Disciplinei de Chirurgie Orală și Maxilo-facială al Universității de Medicină și Farmacie “Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca înregistrând performanțe de vârf în domeniu. Tendințele actuale de evoluție atestă perspectiva creșterii pieței produselor folosite în augmentarea osoasă mult mai accentuată în comparație cu celelalte produse sau dispozitive folosite în medicină.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Ipoteza de lucru

Lucrarea de față își propune să elaboreze noi biomateriale de adiție osoasă produse prin nanotehnologie, care să prezinte o viteză și o calitate superioară de osteointegrare și stimulare a creșterii osoase după transplantare. În acest scop s-a investigat gradul de biocompatibilitate a diferitelor substraturi compozite formate din grafene, nanoparticule de aur (AuNPs) și hidroxiapatită (HA), adiționate cu celule derivate pe linie osoasă precum și influența acestor materiale compozite asupra comportamentului osteoblastelor în ceea ce privește proliferarea și diferențierea terminală în osteocite.

Au fost evaluate schimbările produse de radiația laser cu o lungime de undă de 830 nm pe diferite substraturi de materiale compozite nanostructurate, formate din grafene, nanoparticule de Au și HA nanostructurată. De asemenea s-au identificat efectele pe care le poate avea radiația laser asupra celulelor osteoblaste umane cultivate pe substraturi de materiale compozite nanostructurate. Totodată, s-a urmărit stabilirea parametrilor laser specifici lungimii de undă de 830 nm care produc un efect stimulant asupra celulelor osteoblaste umane aflate în combinație cu nanostructuri compozite. Astfel s-a urmărit rolul pe care îl are radiația laser în creșterea numărului de celule în scop regenerativ.

Studiul 1. Determinarea experimentală a biocompatibilității, a fenomenelor de adeziune și proliferare a osteoblastelor la suprafața biomaterialelor nanostructurate

Obiective

Scopul acestui studiu a fost de a investiga gradul de biocompatibilitate a diferitelor substraturi compozite formate din grafene, nanoparticule de aur (AuNPs) și hidroxiapatită (HA), folosind celule derivate pe linie osoasă precum și influența acestor materiale compozite asupra comportamentului osteoblastelor în ceea ce privește diferențierea terminală în osteocite.

Material și metodă

Materialele compozite pe bază de Au/HA și grafene au fost sintetizate prin metoda CCVD - IH cu acetilenă ca sursă de carbon și în prezența unui catalizator Au/HA.

Materialele compozite pe bază de Au/HA și grafene au fost caracterizate atât morfologic cât și structural prin Microscopie Electronică de Transmisie (TEM), analiză termogravimetrică (TGA) și spectroscopie Raman.

Au fost create șase tipuri de substraturi (suporturi) de materiale compozite: hidroxiapatită (HA) nanostructurată (S1), HA nanostructurată + 1% nanoparticule de aur (GNPs) (S2), HA nanostructurată + 1% nanoparticule de aur (GNPs) + 1,6% grafene (S3), HA nanostructurată + 1% nanoparticule de aur (GNPs) + 3,15% grafene (S4), HA nanostructurată + 1% nanoparticule de aur (GNPs) + 5,1% grafene (S5), HA nanostructurată + 1% nanoparticule de aur (GNPs) + 7,34% grafene (S6).

Pentru experimentele de biocompatibilitate s-au folosit osteoblaste umane izolate din fragmente osoase obținute după o intervenție chirurgicală de artroplastie la nivelul pateleii.

Studiile de biocompatibilitate a hidroxiapatitei, Au/HA precum și a materialelor compozite pe bază de aur, hidroxiapatită și grafene au fost efectuate în cele două condiții speciale de expunere a osteoblastelor la materiale compozite: (1) în prezența a diferite concentrații de suspensii coloidale în mediu de cultură, în culturi pe termen scurt (24, 48 ore și 7 zile) și (2) cultivarea celulelor pe suprafețe de substraturi construite, în culturi pe termen lung (24, 96 ore și după 19 zile de cultivare).

Pentru a evalua efectele substraturilor de compozit asupra comportamentului osteoblastelor în ceea ce privește adeziunea celulară, răspândirea celulară și etapa de diferențiere, a fost realizată, după 19 zile de cultivare, o analiză imunocitochimică pentru fosfataza alcalină, osteopontin (OP) și organizarea fibrelor de actină F.

Analiza statistică a fost efectuată cu un software GraphPad Prism 5 (La Jolla, CA, USA), folosind testul Dunnet Multiple Comparison test. Semnificația statistică a fost stabilită la $p < 0,05$. Pentru analiza testului FDA după 19 zile de cultivare, s-a aplicat testul Tukey Multiple Comparison test, one-way ANOVA.

Rezultate

Analiza imaginilor TEM indică faptul că probele sunt caracteristice pentru câteva straturi de structuri grafite.

Spectrele Raman corespunzătoare pentru compozitele pe bază de Au/HA și grafene indică prezența a câteva straturi de structuri de grafene cu banda caracteristică D (1353.3 cm^{-1}), banda G (1606.4 cm^{-1}) și banda 2D (2702.1 cm^{-1}). Se poate observa o scădere continuă a fluorescenței acestor probe odată cu creșterea timpului de sinteză și o scădere a intensității vârfului de 967 cm^{-1} .

Analiza termogravimetrică ne-a permis să determinăm concentrația grafenelor sintetizate pe suprafața catalizatorului în funcție de timpul de reacție.

Viabilitatea osteoblastelor și proliferarea acestora au fost evaluate cu testul FDA la 24 ore, 48 ore și 7 zile după cultivarea de celule în soluțiile coloidale.

În primele 24 de ore de cultivare a osteoblastelor în contact cu soluții coloidale a fost observată o creștere semnificativă a valorilor de fluorescență pentru tratamentele cu compozitele S2, S3 și S4 la concentrații de 30 și 60 $\mu\text{g/ml}$. După 48 de ore și după 7 zile de cultivare în prezența soluțiilor coloidale, valorile de fluorescență au scăzut semnificativ în aproape toate probele tratate cu suspensiile de compozite.

Prin compararea imaginilor de microscopie de fluorescență se poate observa un număr mai mare de celule care au aderat după 24 de ore de expunere a soluțiilor coloidale cu diferite concentrații, în cazul suspensiilor S3 și S6 la concentrația de (15 $\mu\text{g/ml}$). Culturile de osteoblaste tratate cu suspensiile S1, S2 și S4 cu concentrație de 30 $\mu\text{g/ml}$, au avut cel mai mare număr de celule aderate, prin comparație cu proba control. Crescând concentrația suspensiei coloidale de compozite la 60 $\mu\text{g/ml}$, am observat diminuarea capacității de adeziune celulară la suprafețele din plastic în prezența HA nanostructurate (S1), a Au/HA nanostructurată (S2) și a compozitelor de tipul Au/HA@graphene (S3 și S5).

Utilizând materialele compozite ca și substraturi, am observat un comportament diferit al celulelor legat de concentrațiile nanocompozitelor. La concentrații mici (15 $\mu\text{g/ml}$ și 30 $\mu\text{g/ml}$) substratul S1 (numai HA nanostructurată) și substratul S2 (Au/HA nanostructurată) au fost cele mai favorabile pentru adeziunea și viabilitatea celulară după 24 de ore, în comparație cu celulele martor cultivate fără substrat.

Substraturile compozite cu concentrație mare (60 $\mu\text{g/ml}$) au fost menținute în cultură pentru încă 19 zile. Imaginile de microscopie în contrast de fază au arătat un număr similar de celule osteoblaste cultivate pe substratul S1 (HA nanostructurată) prin comparație cu proba de control și un număr mai mare de celule de pe substraturile S2 (Au/HA nanostructurată) și S5 (Au/HA@grafene). Rezultatele testului FDA al culturilor de celule evaluate în același timp, au arătat o creștere semnificativă statistic a fluorescenței în cazul probei S2 în comparație cu substraturile S4, S5 și S6.

Fosfataza alcalină, o enzimă cheie implicată în procesul de mineralizare, a fost puternic exprimată în S1 (hidroxiapatită nanostructurată) și în substratul S2, în special în mediul extracelular.

Colorarea cu TRITC-faloidină a demonstrat o schimbare profundă asupra morfologiei procesului de adeziune la substrat, cu o creștere a suprafeței celulare și apariția fibrelor de stres actină-F care susțin citoscheletonul. Colorarea actinei a relevat prezența osteoblastelor cu o formă mai aplatizată și dezvoltarea de prelungiri dendritice de către celulele cultivate pe toate substraturile.

Concluzii

În concluzie, rezultatele noastre in vitro indică un nivel scăzut al citotoxicității HA, a Au/HA și a materialelor compozite pe bază de Au/HA@grafene asupra osteoblastelor, în special pentru compozitele cu doze mai mici de grafene. Cultivarea pe termen lung a osteoblastelor pe substraturi de compozite pe bază de Au/HA@grafene, induc favorizarea stării de diferențiere osoasă, cu achiziționarea de osteocite cu fenotip mecanosenzorial care pot fi importante în regenerarea și remodelarea osoasă, cu aplicații potențiale în ingineria țesutului osos prin acoperirea bioactivă a suprafețelor grefelor artificiale.

Studiul 2. Studiu experimental asupra modificărilor produse de radiația laser la nivelul unor substraturi compozite nanostructurate

Obiective

Scopul acestui studiu a fost de a evalua schimbările produse de radiația laser de 830 nm pe diferite substraturi de materiale compozite nanostructurate, formate din grafene, nanoparticule de Au și HA nanostructurată. De asemenea s-a evaluat dacă această radiație laser produce leziuni termice pe substraturile utilizate. Pentru a evidenția modificările produse la nivelul substraturilor, s-a realizat spectroscopia Raman atât înainte cât și după efectuarea iradierii.

Material și metodă

Pulberile de materiale compozite obținute au prezentat elemente diferite, după cum urmează: hidroxiapatită (HA) nanostructurată (S1), hidroxiapatită (HA) nanostructurată + 1% nanoparticule de aur (AuNPs) (S2), hidroxiapatită (HA) nanostructurată + 1% nanoparticule de aur (AuNPs) + 1,6% grafene (S3), hidroxiapatită (HA) nanostructurată + 1% nanoparticule de aur (AuNPs) + 3,15% grafene (S4).

Spectrele Raman au fost colectate la temperatura camerei cu JASCO NRS 3300 spectrofotometru, într-o geometrie de împrăștiere în negru și un detector CCD (Charge Coupled Device) cu o grilă de 1200L/mm și o rezoluție de 7,58 cm^{-1} .

Pentru iradierea substraturilor pe bază de materiale compozite nanostructurate, s-a utilizat un laser cu semiconductori de tipul BTL-10 cu o lungime de undă de 830 nm și o piesă de mână cu o emisie convergentă a radiației. Iradierea s-a realizat în mod pulsant (50 Hz), la o densitate a energiei de 4,4 J/cm^2 . Timpul de iradiere a fost de 30 de secunde pentru fiecare placă de cultură. Măsurarea temperaturii substraturilor pe bază de materiale compozite nanostructurate în timpul experimentului s-a realizat utilizând un multimetru digital.

Rezultate

Analiza calitativă a substraturilor de materiale compozite nanostructurate înainte de iradiere, a fost realizată prin spectroscopia Raman pentru a identifica diferitele componente ale acestora. După iradierea acestor substraturi cu o lungime de undă de 830 nm, s-a efectuat o nouă analiză calitativă a acestor materiale prin spectroscopia Raman. Scopul acestei noi analize a fost de a evidenția eventualele modificări produse la nivelul substraturilor de către radiația laser.

Rezultatele spectroscopiei Raman obținute după iradierea substraturilor S1 și S2 au fost similare cu cele ale substraturilor S3 și S4. Nu au fost identificate modificări ale vârfurilor caracteristice hidroxiapatitei și nanoparticulelor de aur înainte și după iradierea laser cu lungimea de undă de 830 nm.

Concluzii

Laserul cu o lungime de undă de 830 nm nu a produs modificări structurale la nivelul substraturilor iradiate. Prin utilizarea parametrilor laser descriși anterior, nu s-au identificat alterări termice ale substraturilor. Lungimea de undă de 830 nm utilizată în acest studiu ar putea produce modificări în principal la nivel celular și mai puțin la nivelul suporturilor formate din materiale compozite nanostructurate.

Studiul 3. Efectele radiației LASER asupra osteoblastelor umane cultivate pe substraturi de materiale compozite nanostructurate

Obiective

Studiul își propune să identifice efectele pe care le poate avea radiația laser asupra celulelor osteoblaste umane cultivate pe substraturi de materiale compozite nanostructurate. Totodată, s-a urmărit stabilirea parametrilor laser specifici lungimii de undă de 830 nm care produc un efect stimulant asupra celulelor osteoblaste umane aflate în combinație cu nanostructuri compozite. Astfel s-a urmărit rolul pe care îl are radiația laser în creșterea numărului de celule în scop regenerativ.

Material și metodă

Pentru a studia efectele radiației laser asupra celulelor osteoblaste umane cultivate pe substraturi de materiale compozite nanostructurate, au fost create patru tipuri de substraturi folosind suspensii coloidale ale compozitelor nanostructurate în PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline de la Sigma Aldrich), la o concentrație de 30μg/ml.

Colorațiile imunocitochimice au relevat valori pozitive pentru markerii osoși: osteopontin și osteonectin. În cadrul acestor experimente s-au utilizat osteoblaste la al șaptelea pasaj.

Procedura de iradiere laser s-a realizat la nivelul primei serii a câte patru plăci de cultură Nunc cu 96 de godeuri din cele 8 preparate. Iradierea osteoblastelor cultivate pe substraturile de compozite nanostructurate s-a efectuat cu un laser cu semiconductori model BTL-10 (Beautyline, Ltd, Prague, Czech Republic) având lungimea de undă de 830 nm. Procedura de iradiere s-a realizat într-o singură ședință pentru toate cele patru plăci de cultură, la parametri stabiliți conform protocolului de lucru, pe fiecare placă de cultură existând 30 de godeuri cu substraturi și osteoblaste.

Activitatea mitocondrială a celulelor osteoblastice a fost analizată utilizând testul MTT. Plăcile de cultură numerotate de la 1 la 4 au fost supuse testului MTT la 30 minute, 24 ore, 5 zile și respectiv 10 zile de la procedura de iradiere laser.

După realizarea procedurii de iradiere laser, a fost analizată viabilitatea și proliferarea celulelor osteoblaste folosind colorația cu diacetat de fluoresceină.

Pentru analiza testelor MTT și FDA s-a aplicat testul Bonferroni posttest. În plus, pentru compararea tuturor probelor cu controlul neiradiat s-a utilizat testul one-way ANOVA cu Dunnet's Multiple Comparison Test.

Rezultate

Evaluarea viabilității și proliferării osteoblastelor utilizând testul MTT s-a realizat la 30 de minute, 24 de ore, 5 zile respectiv 10 zile după iradierea laser. La 30 de minute după procedura de iradiere laser nu s-au înregistrat diferențe semnificative între celulele iradiate și cele neiradiate, cu excepția osteoblastelor cultivate pe substratul S3 unde s-a observat o scădere a adeziunii acestora post-iradiere. După 24 de ore de la iradierea laser s-a constatat o creștere semnificativă a valorilor testului MTT în cazul osteoblastelor iradiate de pe substraturile S1 și S3. Un comportament similar a fost observat și la nivelul osteoblastelor iradiate de pe substratul S4, dar nu cu diferențe semnificative statistic. La 5 zile post-iradiere s-a evidențiat o uniformizare a valorilor la toate probele. Doar celulele osteoblaste iradiate însămânțate pe substratul S4 au prezentat o scădere a proliferării și viabilității lor. Rezultatele obținute la 10 zile de la iradierea laser au relevat o proliferare crescută a osteoblastelor de pe substratul iradiat S3.

La nivelul osteoblastelor neiradiate s-a observat un număr crescut de celule care au aderat pe toate substraturile după 30 de minute de la iradiere, semnificativ statistic comparativ cu plăcile neacoperite. Comparând celulele neiradiate cultivate pe suprafețe din plastic cu celulele iradiate cultivate pe substraturi, numai substratul S2 s-a dovedit a fi mai favorabil pentru adeziunea celulelor. La 24 de ore după iradiere, diferențele dintre control și

substraturile neiradiate s-au diminuat, însă s-au menținut pentru celulele iradiate pe substraturile S1, S3 și S4. La 5 zile postiradiere doar substratul neiradiat S4 a prezentat o creștere a valorilor semnificativă statistic. O rată de proliferare mai pronunțată a fost observată după 10 zile de iradiere pentru osteoblastele iradiate înșămânțate pe substraturile S2, S3 și S4, precum și pentru celulele neiradiate de pe substratul S4.

Colorația cu diacetat de fluoresceină utilizată pentru analiza viabilității și proliferării celulelor osteoblaste a înregistrat valori similare cu cele obținute prin testul MTT.

Concluzii

Iradierea celulelor osteoblastice cultivate pe substraturi compozite nanostructurate cu un laser cu o lungime de undă de 830 nm a determinat o creștere a fenomenelor de proliferare celulară în primele 24 de ore de la procedură.

Substraturile compozite nanostructurate pe care sunt înșămânțate celulele osteoblastice își manifestă potențialul proliferativ preponderent la o distanță de 5 respectiv 10 zile postiradiere.

Concluzii generale

Studiile experimentale in vitro realizate în cadrul acestei teze au demonstrat un nivel redus al citotoxicității materialelor compozite nanostructurate cu concentrații scăzute de grafene asupra osteoblastelor, creând premisele utilizării acestora în cadrul ingineriei tisulare.

Rata de proliferare a celulelor osteoblaste umane expuse la soluții coloidale de compozite a fost cea mai mare la concentrația maximă. Treptat rata de proliferare celulară a scăzut probabil datorită intrării în procesul de diferențiere spre osteocite.

Modificările față de control apar în exprimarea mai intensă a osteopontinului și în reorganizarea citoskeletonului în funcție de concentrația de grafene, sugerând o activare celulară și o creștere a adeziunii celulare.

Achiziționarea de osteocite cu fenotip mecanosenzorial poate fi importantă în regenerarea și remodelarea osoasă, cu aplicații potențiale în ingineria țesutului osos prin acoperirea bioactivă a suprafețelor grefelor artificiale.

Iradierea substraturilor formate din materiale compozite nanostructurate folosind un dispozitiv laser cu o lungime de undă de 830 nm nu a produs modificări structurale sau alterări termice ale acestora.

Așadar, utilizarea unei astfel de lungimi de undă produce modificări în principal la nivel celular prin stimularea proliferării celulare și mai puțin la nivelul suporturilor formate din materiale compozite nanostructurate.

Combinarea între iradierea celulelor osteoblastice cu un dispozitiv laser cu o lungime de undă de 830 nm și cultivarea acestora pe substraturi compozite nanostructurate favorizează îmbunătățirea fenomenelor de adeziune, proliferare și diferențiere celulară.

Astfel, s-au stabilit parametri laser specifici lungimii de undă de 830 nm care produc un efect stimulant asupra celulelor osteoblaste umane aflate în combinație cu nanostructuri compozite. Această asociere poate fi un instrument util pentru terapia regenerativă osoasă.

Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

Studiile experimentale in vitro realizate prezintă investigarea gradului de biocompatibilitate a diferitelor substraturi compozite formate din grafene, nanoparticule de aur (AuNPs) și hidroxiapatită (HA), folosind celule derivate pe linie osoasă precum și influența acestor materiale compozite asupra comportamentului osteoblastelor în ceea ce privește proliferarea și diferențierea terminală în osteocite. Prin cercetările realizate s-a urmărit identificarea efectelor pe care le poate avea radiația laser asupra celulelor osteoblaste umane cultivate pe suporturi matriceale de materiale compozite nanostructurate.

Elementul de originalitate este dat de combinația dintre utilizarea radiației laser folosită pentru proprietățile sale biostimulante asupra celulelor și de utilizarea unui substrat favorabil dezvoltării și diferențierii celulelor implicate în regenerarea osoasă. Urmărirea efectelor combinate a celor două elemente, radiația laser și substratul compozit nanostructurat, reprezintă un element inovativ atât la nivel național cât și internațional. Cercetările realizate prezintă un grad înalt de originalitate prin obiectivele propuse și prin metodologiile de realizare ale acestora.

Rezultatele studiilor experimentale facilitează cercetătorilor alegerea parametrilor laser corespunzători pentru un efect stimulant asupra celulelor implicate în reconstrucția osoasă, dezvoltând noi direcții de cercetare în domeniul regenerării osoase cu implicarea în cadrul acestora a nanomaterialelor și a nanotehnologiilor.

SUMMARY OF THE PH.D. THESIS

The Use of Nanotechnology in Reconstructive Oral Surgery

Ph.D. Student **Liana Crișan**

Ph.D. Scientific Coordinator **Prof. Dr. Grigore Băciș**

CLUJ-NAPOCA 2015



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION	15
CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	
1. Modalities of obtaining composite materials through nanotechnological processes	19
1.1. Modalities of obtaining composite materials based on carbon nanotubes	19
1.1.1. Preparation of carbon/polymer nanotubes type composites	20
1.1.1.1. The suspension method	20
1.1.1.2. Processing through melting	21
1.1.1.3. In situ polymerization	22
1.1.1.4. The effects of nanotubes on the polymer structures	23
1.1.2. The preparation of carbon/ceramic nanotubes composites	23
1.1.3. The preparation of carbon/carbon nanotubes composites	25
1.1.4. The preparation of carbon/metal nanotubes composites	26
1.1.5. Comparative debates and remarks on the finality of the researches	26
1.2. Modalities of obtaining composite materials based on graphenes	27
1.2.1. Modalities of obtaining the graphenes	28
1.2.1.1. Mechanical exfoliation	28
1.2.1.2. Chemical synthesis	28
1.2.1.3. Chemical vapor deposits (CVD)	29
1.2.2. The preparation of the Au _x /MgO catalysts and of the graphene and gold (Gr-Au-x) based nanocomposites	29
1.2.3. The preparation of Au/HA @ graphene based nanocomposite materials	31
2. Considerations on the osteogenesis through tissue engineering. The biocompatibility of the osteoprogenitor cells with composite materials obtained through nanotechnological processes	33
2.1. Mechanisms for regulating the development and differentiation of the osteoblasts	34
2.1.1. Growth factors	34
2.1.2. Citokines	35
2.1.3. The endocrine system	35
2.1.4. The adhesion molecules	35
2.2. Osteoblasts, osteocytes, and the osteogenesis process	36
2.3. Molecular markers of osteoblastic cells	37
2.4. The harvesting, isolation and obtaining of primary cultures of human osteoblasts	39
2.5. The effects of the cell adhesion phenomenon in the biology of the osteoblast	40
2.6. The cellular adhesion phenomenon at the bone tissue level and at the artificial matrix substrate level	42
PERSONAL CONTRIBUTION	
Working hypothesis/objectives	47
3. Study 1 –The experimental determination of biocompatibility, of the osteoblast adhesion and proliferation on the surface of the nanostructured biomaterials	49
3.1. Introduction	49
3.2. Working hypothesis/objectives	50
3.3. Material and method	51
3.3.1. The preparation of gold (Au), hydroxyapatite (HA) and graphene based composite materials (Au/HA/ graphene)	51
3.3.2. The characterization of gold (Au), hydroxyapatite (HA) and graphene based composite materials (Au/HA/ graphene)	

3.3.3. The preparation of the substrates	52
3.3.4. The cell cultures	53
3.3.5. The evaluation of the cellular proliferation and viability with fluorescein diacetate (FDA)	54
3.3.6. The imunocitochemical coloration	55
3.3.7. Statistical analysis	55
3.4. Results	56
3.4.1. The characterization of graphene + gold nanoparticle (GNPs) + hydroxyapatite (HA) based composite materials	56
3.4.2. Testing the citotoxicity of the colloidal solutions of the composite materials on the osteoblasts	58
3.4.3. The effects of the composite substrate on the adhesion, viability and proliferation of the osteoblasts	61
3.4.4. Imunocitochemical coloration. The influence of the substrate on the process of osteoblast differentiation	64
3.5. Discussion	66
3.6. Conclusions	71
4. Study 2 –Experimental study on the modifications produced by the laser radiation at the level of certain nanostructured composite substrates	73
4.1. Introduction	73
4.2. Working hypothesis/objectives	74
4.3. Material and method	74
4.3.1. The preparation and characterization of the nanostructured composite materials	74
4.3.2. The preparation of the nanostructured composite materials based substrates	75
4.3.3. The laser radiation procedure of the nanostructured composite materials based substrates	76
4.4. Results	77
4.5. Discussion	81
4.6. Conclusions	83
5. Study 3. The effects of LASER radiation on the human osteoblasts cultivated on nanostructured composite materials substrates	85
5.1. Introduction	85
5.2. Working hypothesis/objectives	86
5.3. Material and method	87
5.3.1. The preparation of nanostructured composite materials substrates	87
5.3.2. Cell cultures	87
5.3.3. The Laser radiation procedure of the human osteoblast cells cultivated on substrates.	89
5.3.4. Tests for evaluating the cellular proliferation and viability	93
5.3.4.1. The MTT Test (Thyazolyl Blue Tetrazolium Bromide)	93
5.3.4.2. The FDA Test (Fluorescein diacetate)	94
5.3.5. Statistical analysis	94
5.4. Results	94
5.5. Discussion	99
5.6. Conclusions	102
6. General conclusions	103
7. Originality and innovative contributions of the thesis	105

REFERENCES

107

KEY WORDS: graphene, gold nanoparticles, hydroxyapatite, human osteoblasts, biocompatibility, laser radiation, nanostructured, composite substrates, Raman spectroscopy.

INTRODUCTION

The development at a global level of composite materials is bolstered by the evolution in the field of nanotechnology which has gained dominance recently as a field of greatest actuality, with the greatest dynamic and with a major impact on the industry and society for the next decades.

There have existed ongoing preoccupations in the medical field to replace deteriorated bone elements in the human body with different materials which would be accepted in the human tissue (biocompatible) with perfect integration so that in the area of the material-bone tissue interface the same phenomena should take place as in the case of the bone-bone interface. The major progresses in various medical fields of the past years (cardio-vascular surgeries, ophthalmology, restorative surgery, dental medicine) demonstrate that medicine can overcome its limits only with the help of biotechnologies.

The bone defects of the skeleton represent a serious public health problem through the disorders they produce in the body. The methodology of bone reconstruction has known a series of successes in the past years, along with the progress registered in the field of cellular and molecular biology. Different types of bone transplants are increasingly used internationally in orthopedic surgery, maxillo-facial, dento-alveolar, and periodontal surgery, for bone defects reconstruction. At the national level, there exist intense research preoccupations with the aim of detecting and implementing as advantageous a material as possible for bone reconstruction, the team of the Oral and Maxillo-Facial Surgery Department of the "Iuliu Hațieganu" University of Medicine and Pharmacy Cluj-Napoca registering top performances in the field. The current evolutionary trends prove the perspective of the growth of market for products used in bone augmentation which is a lot more emphasised in comparison to the other products or devices used in medicine.

PERSONAL CONTRIBUTION

Working hypothesis / objectives

This paper aims to elaborate new additional bone biomaterials produced through nanotechnology, which would feature a superior quality and speed of osseointegration and stimulation of bone growth after transplanting. To this end we have investigated the degree of biocompatibility of different composite substrates made up of graphenes, gold nanoparticles, (AuNPs) and hydroxyapatite (HA), additioned with cells derived on a bone line as well as the influence of these composite materials on osteoblasts behaviour in terms of proliferation and terminal differentiation in osteocytes.

We have evaluated the changes produced by the laser radiation with a 830 nm wavelength on different substrates of nanostructured composite materials, made up of graphenes, Au nanoparticles and nanostructured HA. Also, we have identified the effects the laser radiation can have on the human osteoblast cells cultivated on composite nanostructured materials substrates. At the same time, we have sought to establish the specific laser parameters for the 830 nm wavelength which produce a stimulating effect on the human osteoblast cells found in combination with composite nanostructures.

Study 1. The experimental determination of biocompatibility, of the osteoblasts adhesion and proliferation on the surface of nanostructured biomaterials

Objectives

The purpose of this study was that of investigating the degree of biocompatibility of different composite substrates made up of graphenes, gold nanoparticles (AuNPs) and hydroxyapatite (HA), using the cells derived on the bone line as well as the influence of these composite materials on the behavior of the osteoblasts concerning the terminal differentiation in osteocytes.

Material and method

The Au/HA and graphene based composite materials have been synthesized through the CCVD – IH method with acetylene as carbon source and in the presence of a Au/HA catalyst.

The Au/HA and graphene based composite materials have been characterized both morphologically as well as structurally through Transmission Electronic Microscopy (TEM), thermogravimetric analysis (TGA) and Raman spectroscopy.

Six types of composite materials substrates (scaffolds) have been created: nanostructured (HA) hydroxyapatite (S1), nanostructured HA +1% gold nanoparticles (GNPs) (S2), nanostructured HA + 1% gold nanoparticles (GNPs) + 1,6% graphenes (S3), nanostructured HA + 1% gold nanoparticles (GNPs) + 3,15% graphenes (S4), nanostructured HA + 1% gold nanoparticles (GNPs) + 5,1% graphenes (S5), nanostructured HA + 1% gold nanoparticles (GNPs) + 7,34% graphenes (S6).

For the biocompatibility experiments we have used human osteoblasts isolated from bone fragments obtained after an arthroplasty surgical intervention on the patella.

The hydroxyapatite biocompatibility studies, Au/HA as well as of the gold based composite materials, hydroxyapatite and graphenes have been carried out in the two special conditions of exposure of the osteoblasts to composite materials: (1) in the presence of different concentrations of colloidal suspensions in a culture medium, in short term cultures (24, 48 hours and 7 days) and (2) the cultivation of cells on surfaces of built substrates, in long term cultures (24, 96 hours and 19 days after cultivation).

To assess the effects of composite substrate on osteoblasts behavior in terms of cell adhesion, cell spreading and differentiation stage, an immunocytochemical analysis for alkaline phosphatase (ALP), osteopontin (OP) and actin-F fibers organization was performed after 19 days of cultivation.

The statistical analysis was carried out with an GraphPad Prism 5 software (La Jolla, CA, USA), using the Dunnett Multiple Comparison test. The statistical significance was established at $p < 0,05$. For the analysis of the FDA test after 19 days of cultivation, the Tukey Multiple Comparison test, one-way ANOVA, was applied.

Results

The analysis of TEM images indicates that the samples are characteristic to the few-layer graphitic structures.

The corresponding Raman spectra for the Au/HA based composites and graphenes indicate the presence of several layers of graphene structures with characteristic band D (1353.3 cm^{-1}), band G (1606.4 cm^{-1}) and band 2D (2702.1 cm^{-1}).

A continuous decrease in the fluorescence of Raman spectra for these samples with the synthesis time and a decrease of the 967 cm^{-1} HA peak intensity can be observed.

The thermogravimetric analysis allowed us to determine the concentration of the graphenes synthesized on the surface of the catalyst depending on the reaction time.

The viability of the osteoblasts and their proliferation were evaluated with the FDA test at 24 hours, 48 hours and 7 days after the cultivation of cells in colloidal solutions.

In the first 24 hours of cultivation of osteoblasts in contact with colloidal solutions a significant increase in fluorescence values for the treatments with S2, S3 and S4 composites at concentrations of 30 and 60 $\mu\text{g/ml}$ was observed. After 48 hours and after 7 days of culture in presence of colloidal suspensions the fluorescence values decreased significantly in almost all samples treated with composite suspensions.

Comparing with fluorescence microscopy images of FDA stained cells after 24 hours of exposure to colloid suspensions with different concentrations a greater number of adhered cells in S3 and S6 samples with low concentration (15 $\mu\text{g/ml}$) was seen, an observation that was confirmed by the results of fluorimetric measurements. Osteoblasts cultures treated with S1, S2 and S4 suspensions with concentration of 30 $\mu\text{g/ml}$, have had the highest number of adhered cells when were compared with control untreated cells. Increasing the concentration of colloidal suspension of composites to 60 $\mu\text{g/ml}$, induced a decrease of cell adhesion capacity to plastic surfaces in presence of nanostructured HA (S1), nanostructured Au/HA (S2) and Au/HA@graphene composites (S3 and S5).

Using the composite material as substrates, we observed a different behavior of the cells regarding the nanocomposites concentrations. At low concentration (15 $\mu\text{g/ml}$ and 30 $\mu\text{g/ml}$) of nanostructured HA (S1) and nanostructured Au/HA (S2) substrate showed to be the most favorable for cell adhesion and viability after 24 hours by comparison with control cells cultivated on plastic surfaces without substrate.

Composite substrates with high concentration (60 $\mu\text{g/ml}$) were kept in culture for another 19 days. Phase contrast microscopy images revealed a similar number of osteoblasts cultivated on nanostructured HA (S1) substrate cells by comparison with the control sample, and a higher number of cells on nanostructured Au/HA (S2) and Au/HA@graphene composites S5 substrates. FDA assays results of cultures evaluated at the same time, showed a statistical significant increase of fluorescence in S2 sample, versus S4, S5 and S6 substrates.

Alkaline phosphatase, a key enzyme implicated in the mineralization process, was strongly expressed in S1 (nanostructured hydroxyapatite) and S2 substrates, especially in the extracellular environment.

Staining with TRITC phalloidin has demonstrated a profound change on the cells morphology in relation with the adhesion process to the substrate, with an increase in cell surface area and with appearance of F-actin stress fibers. Staining of filamentous actin revealed the presence of osteoblasts with a more flattened shape and development of dendritic spines by the cells cultivated on all substrates.

Conclusions

In conclusion, our *in vitro* results indicate low cytotoxicity on osteoblasts of HA, Au/HA and Au/HA@graphene composites, especially for composites with lower doses of graphene. Long term cultivation of osteoblasts on substrates with Au/HA@graphene composites, induced a more favorable bone differentiation, with acquisition of a mechanosensorial osteocyte phenotype that can be important in bone regeneration and remodeling, with potential applications in bone tissue engineering as bioactive coatings of implants surfaces.

Study 2. Experimental study concerning the modifications produced by the laser radiation at the level of certain nanostructured composite substrates

Objectives

The purpose of this study was to evaluate the changes produced by the 830 nm laser radiation on different substrates of nanostructured composite materials, made up of graphenes, nanoparticles of Au and nanostructured HA. Also, we have evaluated whether or not this laser radiation produces thermal damage on the substrates used. In order to highlight the changes produced at the level of the substrates, the Raman spectroscopy was performed both before as well as after the irradiation.

Material and method

The powders of composite materials obtained presented different elements, as follows: (S1) nanostructured hydroxyapatite (HA), (S1) nanostructured hydroxyapatite (HA) + 1% gold nanoparticles (AuNPs) (S2), nanostructured hydroxyapatite (HA) + 1% gold nanoparticles (AuNPs) + 1,6% graphenes (S3), hydroxyapatite (HA) nanostructured + 1% gold nanoparticles (AuNPs) + 3,15% graphenes (S4).

The Raman spectra were collected at room temperature with a JASCO NRS 3300 spectrophotometer in a black-scattering geometry and a CCD detector with a 1200L/mm grid and a resolution of 7.58 cm^{-1} .

For irradiation a semiconductor laser type BTL-10 (Beautyline, Ltd., Prague, Czech Republic) with a wavelength of 830 nm and a hand piece with a convergent radiation emission was used. The irradiation was performed in pulse mode (50 Hz) and the energy density of 4.4 J/cm^2 . The irradiation time was 30 seconds for each culture plate containing different nanostructured substrate. The temperature of substrates irradiated with laser was measured during the experiment by using a digital multimeter.

Results

The qualitative analysis of the nanostructured composite materials before irradiation was performed through Raman spectroscopy in order to identify the latter's components. After the irradiation of these substrates with an 830 nm wavelength, a new qualitative analysis of these materials was carried out through Raman spectroscopy. The purpose of this new analysis was to highlight the possible changes produced at the level of the substrates by the laser radiation.

The results of the Raman spectroscopy obtained after the irradiation of the S1 and S2 substrates were similar with those of the S3 and S4 substrates. No modifications of the peaks characteristic of the hydroxyapatite and gold nanoparticles were identified before and after the laser irradiation with the wavelength of 830 nm.

Conclusions

The laser with an 830 nm wavelength did not produce structural changes at the level of the irradiated substrates. By using the laser parameters described before, thermal changes of the substrates have not been identified. The 830 nm wavelength used in this study could produce changes mainly at the cellular level and less at the level of scaffolds formed by nanostructured composite materials.

Study 3. The effects of LASER radiation on the human osteoblasts cultivated on substrates of nanostructured composite materials

Objectives

The study aims to identify the effects that laser radiation can have on the human osteoblast cells cultivated on nanostructured composite materials. At the same time, we have sought the specific laser parameters for the 830 nm wavelength which creates a stimulating effect on the human osteoblast cells in combination with composite nanostructures. Thus we have sought the role the laser radiation has in the increasing of the number of cells with a regenerative purpose.

Material and method

In order to study the effects of laser radiation on the human osteoblast cells cultivated on nanostructured composite materials substrates, four types of substrates have been created using colloidal suspensions of the nanostructured composites in PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline from Sigma Aldrich), at a concentration of 30 µg/ml.

The immunocytochemical colorations have revealed positive values for the bone markers: osteopontin and osteonectin. Within these experiments we have used osteoblasts at the seventh passage.

The laser irradiation procedure was carried out at the level of the first series of four Nunc culture plates with 96 wells each out of the 8 prepared. The irradiation of the osteoblasts cultivated on the nanostructured composite substrates was carried out with a semiconductor laser model BTL-10 (Beautyline, Ltd, Prague, Czech Republic) having a wavelength of 830 nm. The irradiation procedure was carried out in a single session for all the four culture plates, at the parameters set according to the work protocol, there existing 30 wells with substrate and osteoblasts on each culture plate.

The mitochondrial activity of the osteoblast cells was analyzed using the MTT test. The culture plates numbered 1 to 4 have been tested with the MTT test at 30 minutes, 24 hours, 5 days and 10 days, respectively from the laser irradiation procedure.

After the performance of the laser irradiation, the viability and proliferation of the osteoblast cells was analyzed using the fluorescein diacetate coloration.

For the analysis of MTT and FDA tests, the Bonferroni posttest was applied. Moreover, for the comparison of all samples with the nonirradiated control, the one-way ANOVA test with Dunnet's Multiple Comparison Test was used.

Results

The evaluation of the viability and proliferation of osteoblasts using the MTT test was performed at 30 minutes, 24 hours, 5 days and respectively 10 days after the laser irradiation. At 30 minutes after the laser irradiation procedure no significant differences were registered between the irradiated and the non-irradiated cells, with the exception of osteoblasts cultivated on the S3 substrate where a decrease of the latter's adhesion post-irradiation was observed. At 24 hours after the laser irradiation a significant increase of the MTT test values was noticed in the case of the irradiated osteoblasts from the S4 substrate, but not with statistically significant differences. At 5 days after irradiation the uniformisation of the values in all samples stood out. Only the irradiated osteoblast cells seeded on the S4 substrate presented a decrease in their proliferation and viability. The results obtained 10 days after the laser irradiation have revealed an increased proliferation of the osteoblasts from the irradiated substrate S3.

At the level of the non-irradiated osteoblasts, an increased number of cells which have adhered to all the substrates in 30 minutes after the irradiation have been observed, statistically significant in comparison to the noncovered plates. Comparing the nonirradiated cells cultivated on plastic surfaces with the irradiated cells cultivated on substrates, only the S2 substrate proved to be more favorable than cell adhesion. At 24 hours after the irradiation, the difference between the control and the nonirradiated substrates have diminished, but remained the same for the cells irradiated on the substrates S1, S3 and S4. Five days after irradiation only the non irradiated substrate S4 presented a statistically significant increase of values. A more pronounced proliferation rate was

noticed after 10 days from irradiation in case of the irradiated osteoblasts seeded on the S2, S3, and S4 substrates, as well as the non irradiated cells on the S4 substrate.

The fluorescein diacetate coloration used to analyse the viability and proliferation of the osteoblast cells registered similar values with the ones obtained through the MTT test.

Conclusions

The irradiation of the osteoblast cells cultivated on nanostructured composite substrates with a laser with a 830 nm wavelength determined an increase of the cellular proliferation in the first 24 hours after the procedure.

The nanostructured composite substrates on which osteoblast cells are seeded manifest their mostly proliferating potential at a distance of 5 respectively 10 days after irradiation.

General conclusions

The experimental in vitro studies performed within the aims of this thesis demonstrate a low level of cytotoxicity of the nanostructured composite materials with low concentrations of graphenes on the osteoblasts, creating the premises of the latter's use within tissue engineering.

The proliferation rate of the human osteoblast cells exposed to composite colloidal solutions was the highest at the maximum concentration. Gradually the cellular proliferation rate decreased probably due to entering into the process of differentiation towards the osteocytes.

The changes in comparison to the control appear in the more intense expression of the osteopontin and in the reorganizing of the cytoskeleton depending on the concentration of graphenes, suggesting cellular activation and growth of the cellular adhesion.

The acquisition of osteocytes with mechanosensorial fenotype can be important in bone regeneration and remodeling, with potential applications in bone tissue engineering through bioactive coverage of the artificial grafts surfaces.

The irradiation of the substrates made up of nanostructured composite materials using a laser device with 830 nm wavelength did not produce structural modifications or thermal alterations of the latter.

Therefore, the use of this kind of wavelength produces changes mainly at the cellular level through the stimulation of cell proliferation and less so at the level of the scaffolds made up of nanostructured composite materials.

The combination between the irradiation of the osteoblast cells with a laser device with an 830 nm wavelength and the latter's cultivation on nanostructured composite substrates favors the improvement of cellular adhesion, proliferation, and differentiation.

Thus, laser parameters specific to the 830 nm wavelength which produce a stimulating effect on the human osteoblast cells in combination with composite nanostructures were set. This association can be a useful appliance for the regenerative bone therapy.

The originality and innovative contributions of the thesis

The in vitro experimental studies carried out present the investigation of the degree of biocompatibility of different composite substrates made up of graphenes, gold nanoparticles (AuNPs) and hydroxyapatite (HA), using bone derived cells as well as the influence of these composite materials on the behavior of the osteoblasts concerning the proliferation and terminal differentiation in osteocytes. The research carried out aimed to identify the effects the laser radiation can have on the human osteoblast cells cultivated on nanostructured composite materials matrix scaffolds.

The element of originality is given by the combination between the use of laser radiation employed for its biostimulating properties on cells and the use of a substrate favorable to the development and differentiation of the cells involved in the bone regeneration. Following up the combined effects of the two elements, the laser radiation and the nanostructured composite substrate represents an innovative element both at the national and international level. The research carried out present a high degree of originality through the set objectives and through the methodology of carrying out these objectives.

The results of the experimental studies facilitate for the researchers the choosing of laser parameters suitable for a stimulating effect on the cells involved in the bone reconstruction, developing new research directions in the field of bone regeneration with the involvement of nanomaterials and nanotechnologies.