

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare

Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

Raport științific

Perioada implementare ianuarie-martie 2024

Scopul general al proiectului intitulat "Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma", acronim REOSTEOMi, este acela de a îmbunătăți starea de sănătate a indivizilor prin introducerea unor abordări unice în medicina regenerativă a țesutului osos. Aceste abordări nu numai că optimizează și personalizează terapiile celulare și acelulare existente pentru complicațiile legate de fracturile osoase, ci și aplică cunoștințele dobândite pentru a dezvolta noi dispozitive biomedicale destinate tratării complicațiilor asociate mielomului multiplu (MM). REOSTEOMi își propune să fabrice substituenți osoși cu o eficiență regenerativă mult îmbunătățită în comparație cu opțiunile de tratament actuale pentru restaurarea defectelor osoase. Pentru atingerea acestui obiectiv, se vor investiga suporturi nanostructurate funcționalizate, obținute din noi formulări imprimabile pe bază de biopolimeri/diverse tipuri de grafenă/bioconjugate cu oligonucleotide antisens (ASO), prelucrate prin tehnica bioprintării 4D/5D. Această abordare va permite evaluarea biodisponibilității ASO la nivelul țesutului și inhibarea acidului ribonucleic necodificator (ARNnc). În etapa 3, ce s-a desfășurat în perioada ianuarie-martie 2024, activitățile științifice s-au concentrat, pe de-o parte, pe modificarea și obținerea de formulări compozite printabile cu nanomateriale grafenice, fabricarea de scaffolduri prin printare 3D și studierea scaffoldurilor utilizând diferite metode de analiză, iar pe de altă parte, efectuarea unor investigații in silico și experimente ale adsorbției și desorbției ASO de pe platforme grafenice. Astfel, activitățile de cercetare sunt subscrise următoarelor activități din planul de realizare al proiectului:

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare

Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

Activitatea 1. Printarea 3D în condiții speciale de substituenți osoși personalizați.

Subactivitatea 1.1. Identificarea stimulilor cheie pentru dezvoltarea formulărilor pentru printare 4D.

Subactivitatea 1.2. Modificarea unor formulări printabile 3D aprobate de FDA.

În cadrul acestei activități s-au realizat:

- Sinteza de gelatină metacrilată (GelMA) prin modificare cu anhidridă metacrilică;
- Sinteza de gelan metacrilat (GGMA) prin modificare cu anhidridă metacrilică;
- Pregătirea probelor de GelMA și GGMA prin purificare și îngheț pentru liofilizare;
- Liofilizarea probelor de GelMA și GGMA.

Subactivitatea 1.3. Obținerea de formulări printabile compozite cu nanomateriale grafenice pe baza cernelurilor dezvoltate în subactivitățile 1.1 și 1.2.

În desfășurarea acestei subactivități s-au realizat:

- Experimente de printare 3D cu formulări printabile pe bază de GelMA și pectină. Au fost experimentate diferite metode de printare, dar și diferite formulări (concentrații de GelMA și pectină diferite). S-a stabilit un protocol de sinteză pentru formularea nanocompozită;
- Experimente de printare 3D cu formulări printabile pe bază de GelMA, alginat de sodiu și fenil-litium-2,4,6-trimetilbenzoilfosfinat (LAP). Au fost experimentate diferite metode de printare, dar și diferite formulări (concentrații de GelMA, alginat de sodiu și LAP diferite). S-a stabilit un protocol de sinteză pentru formularea printabilă nanocompozită;
- Experimente de printare 3D cu formulări printabile nanocompozite pe bază de GelMA/alginat de sodiu/grafenă aminată. Dispersia grafenei aminate s-a realizat prin ultrasonare și au fost experimentate diferite metode de printare, dar și diferite formulări;

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare

Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

- Suporturi nanocompozite din gelatină, gelan, nanofibre de celuloză și materiale grafenice (grafenă aminată, grafenă carboxilată și grafenă aminată/grafenă carboxilată), care au fost ulterior pregătite pentru testarea proprietăților mecanice;

- Formulări printabile simple și nanocompozite dezvoltate folosind GelMA și GGMA, împreună cu oxid de grafenă (GO) și stabilizate prin fotoreticulare cu LAP și clorură de calciu (CaCl_2).

Subactivitatea 1.8. Controlul funcțional și de calitate al componentelor Activității 1.

În cadrul acestei subactivități s-au analizat:

- Evaluarea procesului de modificare a gelanului și a gelatinei prin metacrilare, utilizând tehnicile de rezonanță magnetică nucleară (RMN) și spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier (FTIR);

- Evaluarea proprietăților mecanice ale suporturilor 3D din gelatină/gelan/grafenă aminată/grafenă carboxilată și nanofibre de celuloză prin teste de tracțiune, compresiune și forfecare.

Activitatea 2. Dezvoltarea de nanoplatforme 2D și 3D pentru livrarea de ARNnc complementar.

Subactivitatea 2.1. Simulări de dinamică moleculară (DM) ale procesului de livrare de ARNnc și ASO complementare pe nanoplatforme grafenice.

În cadrul acestei subactivități s-au realizat:

- Simulările computaționale, demarate anterior, de implementare a modelelor computaționale cubice.

Subactivitatea 2.2. Simulări DM ale cineticii de auto-asamblare a cuștilor ADN și încărcarea ASO.

În desfășurarea acestei subactivități s-au efectuat:

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare

Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

- Simulari de dinamică moleculară pentru a studia stabilitatea în medii complexe, cineticile de autoasamblare, dezasamblare, auto-reasamblare, dimensiuni și geometrii ale cuștilor ADN.

Subactivitatea 2.3. Obținerea experimentală a nanoplatformelor grafenice și a cuștilor ADN.

În cadrul acestei subactivități s-au desfășurat:

- Experimente de laborator care au vizat sinteza de nanoplatforme cu grafenă redusă PEG-aminată (NH₂-PEG-rGO) pentru a studia adsorbția și desorbția secvențelor ASO de ADN marcat fluorescent.

Subactivitatea 2.4. Controlul funcțional și de calitate al componentelor Activității 2.

În desfășurarea acestei subactivități s-au realizat:

- Analize de fluorescență, morfologie, structură și unghi de contact pentru nanoplatformele cu grafenă redusă PEG-aminată;

- Analiza și prelucrarea rezultatelor obținute în urma tuturor investigațiilor efectuate pe nanoplatformele de grafenă redusă PEG-aminată, în ceea ce privește adsorbția și desorbția ASO, pentru elaborarea unui articol științific;

- Elaborarea și publicarea articolului științific cu titlul „Solid Phase Oligo-DNA Extraction from Complex Medium Using an Aminated Graphene/Nitrocellulose Nanoplatforme Hybrid” (<https://doi.org/10.3390/biom14030366>), acceptat în jurnalul Biomolecules, MDPI (I.F. 5.5).

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare

Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

PARTEA I

Medicina regenerativă a țesutului osos reprezintă un domeniu de vârf în cercetarea biomedicală, axat pe dezvoltarea și aplicarea unor strategii inovatoare pentru stimularea naturală a regenerării țesuturilor osoase deteriorate sau afectate. În acest context, proiectul REOSTEOMi abordează tehnologii avansate precum bio-printarea 3D și sinteza de materiale, alături de adaptarea terapilor personalizate. Prin urmare, un obiectiv principal al proiectului constă în fabricarea de înlocuitori osoși cu o eficiență regenerativă îmbunătățită, reprezentând astfel o contribuție semnificativă la tratarea unei game variate de probleme, de la fracturi obișnuite la complicații asociate cu boli precum MM.

Un alt obiectiv al proiectului este studierea moleculelor ASO pentru tratarea complicațiilor asociate cu MM. Aceste molecule ASO reprezintă o modalitate promițătoare de intervenție la nivel genetic pentru gestionarea și tratarea eficientă a complicațiilor legate de această afecțiune complexă. Prin abordarea moleculară specifică, se vizează reducerea sau inhibarea expresiei genelor implicate în patogeneza MM și a complicațiilor sale asociate. Integrarea studiului moleculelor ASO în cadrul proiectului REOSTEMi demonstrează angajamentul către identificarea și dezvoltarea de terapii personalizate și inovatoare pentru pacienții afectați de MM, deschizând astfel perspective noi în domeniul oncologiei și al medicinei personalizate.

Astfel, în cadrul acestui studiu, s-au desfășurat, pe de-o parte, experimente pentru a dezvolta înlocuitori osoși personalizați, folosind tehnologia avansată de bio-printare 3D, care implică formularea de cerneluri compozite integrate cu nanomateriale pe bază de grafenă

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare

Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

aminată. Designul acestor cerneluri se bazează pe optimizarea formulărilor de bio-cerneluri, cu o atenție deosebită acordată sinergiilor dintre GelMA și pectină, precum și GelMA și alginat de sodiu.

Pe de altă parte, s-au efectuat studii și s-au elaborat protocoale în ceea ce privește sinteza de nanoplatforme cu grafenă redusă PEG-aminată pentru adsorbția și desorbția moleculelor ASO din medii ionice. În cadrul acestor investigații s-au efectuat, de asemenea, și analize de fluorimetrie (teste optice) pentru evaluarea adsorbției și desorbției moleculelor ASO de ADN monocatenar (mADN) marcat fluorescent pe nanoplatforme utilizate.

Materiale și Metode:

CAPITOL 1.1

Sinteza gelatinei metacrilate. Gelatina (20 g) fost modificată chimic prin adăugarea de grupări de metacrilamidă, rezultând derivatul GelMA în urma unei reacții directe cu anhidrida metacrilică (745 μ L) în soluție de 400 mL tampon fosfat salin (TFS). Ajustarea pH-ului (Figura 1.1) și stabilizarea acestuia în intervalul 7.5-8.5 s-au realizat prin utilizarea unei soluții de hidroxid de sodiu (NaOH) cu o concentrație de 1 M. Acest proces a fost aplicat pentru a proteja reacția de amidare, care a avut loc simultan cu reacția de metacrilare.

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare

Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

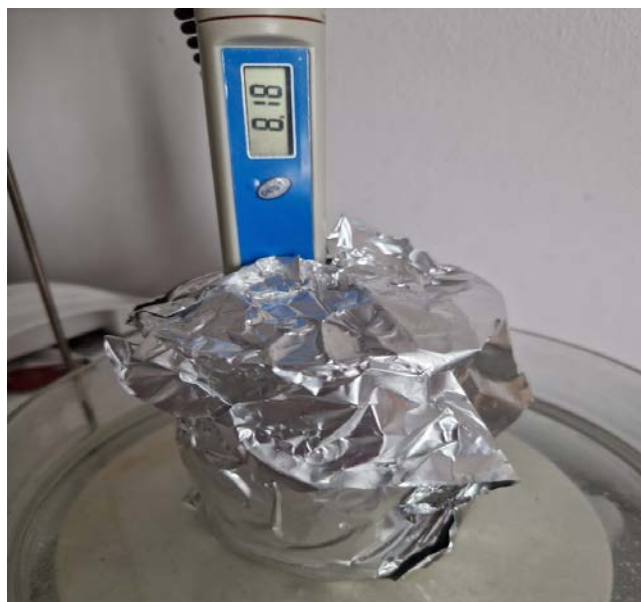


Figura 1.1. Controlul pH-ului în procesul de metacrilare al gelatinei.

Oprirea reacției de metacrilare a implicat adăugarea unui volum de TFS de trei ori mai mare decât cantitatea inițială de polimer. În vederea obținerii de produse finale pure și sigure pentru aplicații biologice, soluția a fost procesată folosind nanoplatforme de dializă timp de o zi, cu schimbarea apei o dată la 12 ore. Acest procedeu a fost implementat pentru îndepărtarea excesului de inițiatori sau a altor impurități care ar putea persista în soluție după reacția de metacrilare. Ulterior, soluțiile din interiorul nanoplatformelor au fost transferate în cutii Petri și congelate pentru a fi supuse ulterior procesului de liofilizare (Figura 1.2).

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare

Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

Figura 1.2. Procesul de liofilizare al GelMA.

Liofilizarea s-a desfășurat la o presiune de 0.28 bari timp de 48 de ore, după care GelMA a fost depozitată la temperatura camerei. După acest proces se așteaptă ca mostrele să prezinte o structură uscată, solidă și poroasă, așa cum se evidențiază în figura 1.3. Caracteristicile distinctive ale probelor după liofilizare pot varia în funcție de compoziția inițială și parametrii specifici ai procesului. În general, se pot identifica aspecte cheie, cum ar fi textura poroasă.

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare

Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

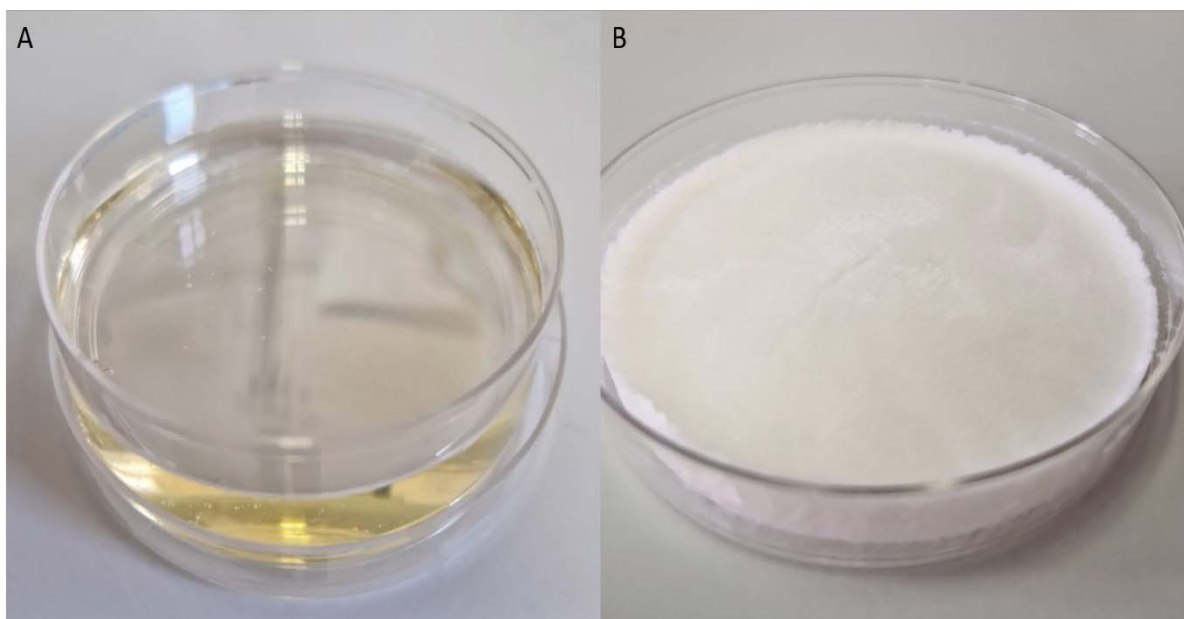


Figura 1.3. (A) GelMA înainte de liofilizare și (B) GelMA după liofilizare.

Gradul de metacrilare al gelatinei prin analiza RMN. Evaluarea modificării gelatinei cu anhidridă metacrilică a fost efectuată folosind tehnica de spectrometrie ^1H -RMN. Gradul de metacrilare (GM) poate fi calculat din imaginile de spectrometrie RMN din figura 1.4 și se referă la proporția de grupări metacrilate ($\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)\text{COO}-$) în raport cu totalul grupărilor funcționale ale unui compus sau material.

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare

Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

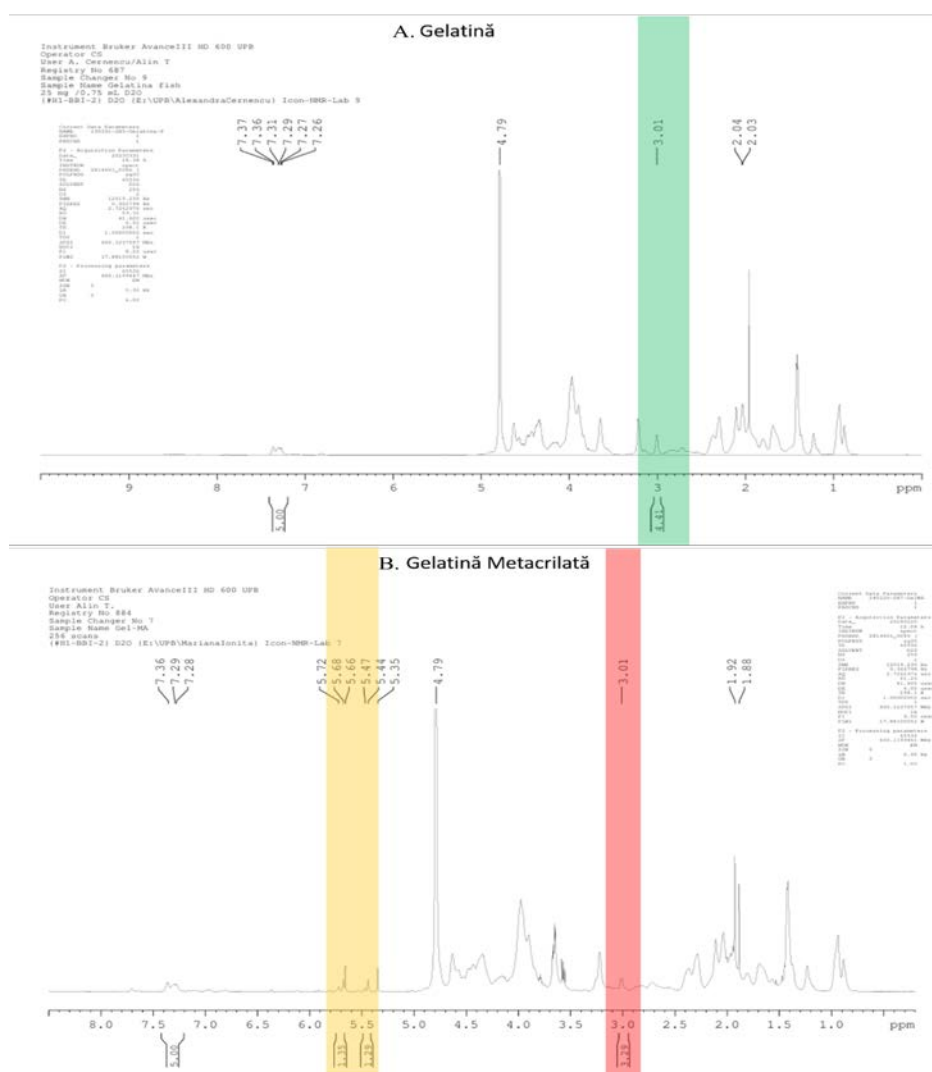


Figura 1.4. Spectrele RMN pentru (A) gelatină (verde-semnalul integrat al lisinei) și (B) gelatină metacrilată (roșu-semnalul integrat al lisinei, galben-semnalele integrate ale grupărilor metacrilice).

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare

Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

În cazul GelMA, pentru a calcula gradul de metacrilare s-a folosit relația (1.1.):

$$\%GM = \left(1 - \frac{\text{Semnalul integrat al Lizinei din GelMA}}{\text{Semnalul integrat al Lizinei din Gelatină}} \right) \times 100, \quad (1.1.)$$

În acest context, semnalele de amină ale lizinei modificate cu metacrilamidă au fost standardizate prin utilizarea semnalelor de fenilalanină ca referință internă. Conform ecuației și analizelor RMN prezentate în figura 1.4, gradul de metacrilare al gelatinei este de 25%. Aceasta înseamnă că 25% din grupările funcționale ale lanțului de gelatină au suferit modificări chimice pentru a deveni grupări metacrilate, în timp ce restul de 75% din grupările funcționale au rămas neschimbate.

Elaborarea unui protocol de sinteză pentru formulările printabile din GelMA, alginat și grafenă aminată.

Formulările printabile au fost realizate prin dizolvarea a 10% alginat în 8 mL apă distilată, urmând adăugarea a 6% GelMA în amestec, la o temperatură de 40°C. Inițial, s-a efectuat printarea cu acest compozit, iar ulterior, s-a adăugat 0.125% grafenă aminată. Astfel, pentru a evalua impactul grafenei aminate asupra posibilității de printare a formulărilor, aceasta a fost supusă ultrasonării (figura 1.5) în soluția de alginat/GelMA pentru o durată de 2 ore. Amplitudinea vibrațiilor vârfului sondei a fost setată la 40% pe întreaga durată a procedurii, cu pulsații timp de 10 secunde și 5 secunde pauză.

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare

Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma



Figura 1.5. Dispersarea grafeinei aminate în amestecul de polimeri prin ultrasonare.

Reticularea formulărilor printabile.

Ca agent fotoinițiator pentru procesul de reticulare a fost folosit LAP, adăugându-l în soluție utilizând o concentrație de 0.6% din cantitatea de polimer. Acesta are capacitatea de a iniția reticularea la o lungime de undă de 405 nm.

Parametrii de lucru

Evaluarea printabilității materialelor a fost realizată folosind procesul de printare prin extrudare directă cu ajutorul bioimprimantei BIO X6 (CELLINK). Procesul de printare al

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare

Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

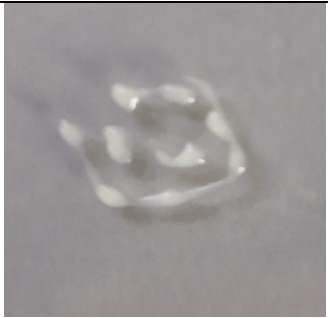
Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

structurilor 3D s-a desfășurat la temperatura de 37 °C pentru toate formulările. Prima formulare printabilă utilizată a fost cea fără grafenă aminată adăugată, iar parametrii de lucru testați se regăsesc în tabelul 1.1 Aceste structuri au fost extrudate direct în cutii Petri de sticlă, testând nu doar presiunea și viteza de printare, ci și diferite tipuri de ace cu dimensiuni variate: 23 Gauge (G) (portocaliu), 25G (roșu) și 32G (galben), corespunzând diametrelor interioare de 0.6 mm, 0.5 mm și, respectiv, 0.27 mm.

Reticularea structurilor s-a realizat atât prin expunerea fiecărui strat la lampa UV a aparatului de printare pentru o perioadă de 30 de secunde, care funcționează cu o intensitate de 30 mW și are o lungime de undă de 405 nm, cât și prin reticulare chimică, prin imersarea structurilor timp de 10 minute într-o soluție de 2% CaCl₂.

Tabel 1.2. Parametri utilizați în procesul de printare al formulării din GelMA și alginat.

GelMA-Alginat			
Tipul acului folosit	Presiune (kPA)	Viteza capului de printare (mm/s)	Imagini ale structurii printate
23G (0.6 mm diametru interior)	180	10	

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare



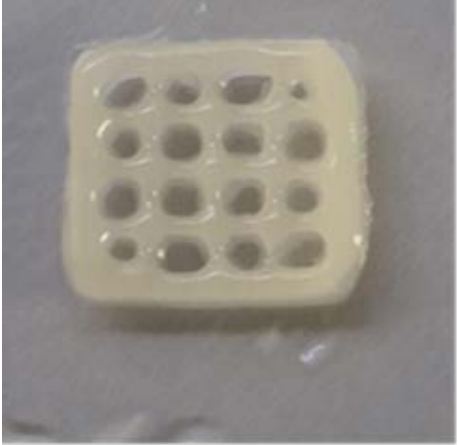
Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

	250	5	
	250	4	

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare


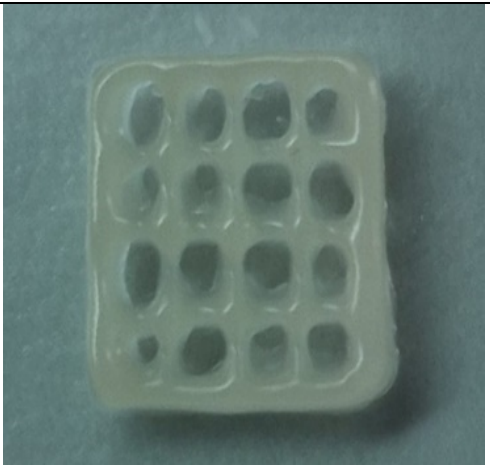
Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

	240	4	
	230	3	

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare


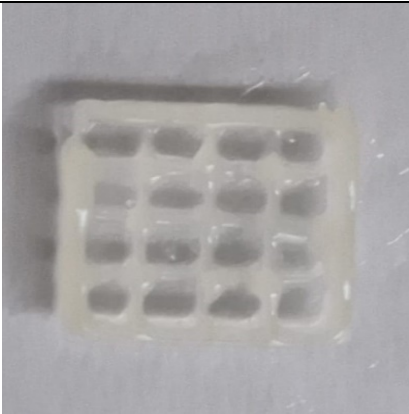
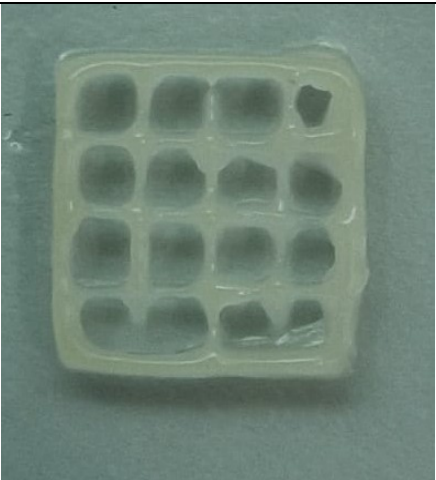
Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

<p>25 G (0.5 mm diametru interior)</p> 	<p>300</p>	<p>3.7</p>	
	<p>300</p>	<p>3.5</p>	

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare

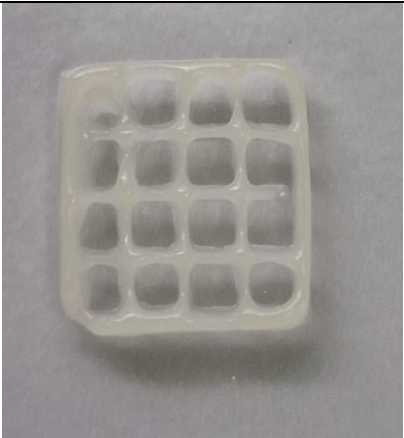
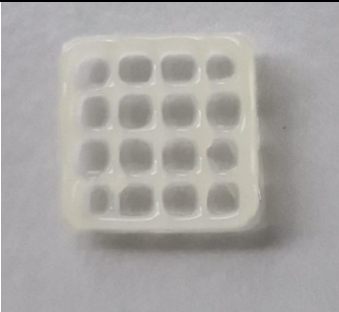

Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

	295	3.5	
	295	3.3	
	285	3	

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare



Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

<p>32 G (0.27 mm diametru interior</p> 	<p>700 (presiunea maximă a bioimprimantei)</p>	<p>3</p>	
---	--	----------	---

Dintre toți parametri analizați în cadrul formulării GelMA-alginat, conform datelor prezentate în tabelul 1.1., s-a constatat că cele mai bune rezultate au fost obținute prin utilizarea vârfului roșu având o dimensiune de 25G, o viteză a acului de printare între 3.3 și 3.5 mm/s și o presiune de 295 kPa. Acești parametri au demonstrat furnizarea celei mai bune fidelități de printare, comparabilă cu modelul CAD din Figura 1.6 (caracterizată prin linii drepte și subțiri, precum și porii interiori cu o structură pătrată).

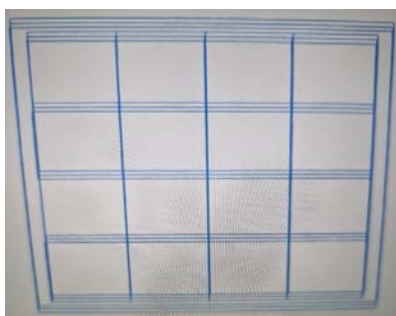


Figura 1.6. Modelul CAD utilizat pentru printare.

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare

Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213


Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

Adăugarea a 0.125% grafenă aminată în soluția de GelMA-alginat a condus la modificarea vâscozității formulării, rezultând structuri mai încărcate cu material și cu pori mai ovalizați. Prin urmare, conform tabelului 1.2, cei mai buni parametri utilizați în acest caz pentru a obține fidelitate de printare similară cu modelul CAD, au fost o viteză a acului de printare de 4 mm/s și o presiune de 280 kPA.

Tabel 1.2. Parametrii utilizați în procesul de printare al formulărilor compuse din GelMA, alginat și grafenă aminată.

GelMA-alginat-grafenă aminată			
Tipul acului folosit	Presiune (kPA)	Viteza capului de printare (mm/s)	Imagini ale structurii printate
25 G (0.5 mm diametru interior)	300	3.3	

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare

Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

	290	3.3	
	290	4	
	280	4	

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare

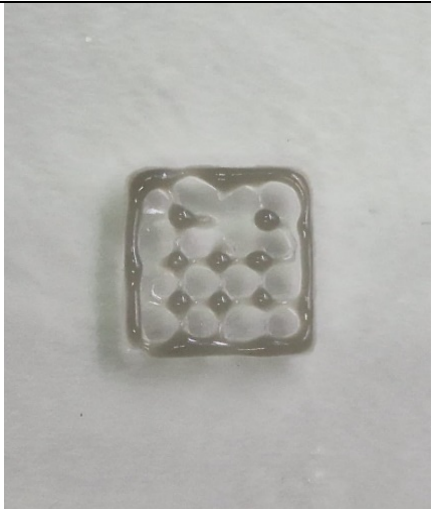
Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

	270	4	
--	-----	---	---

Elaborarea unui protocol de sinteză pentru formulările printabile din GelMA și pectină

Formulările printabile au fost realizate prin adăugarea a 0.6% GelMA și a 0.6% pectină în 8 mL apă sub agitare la o temperatură de 50°C. În acest caz, pentru reticularea structurilor s-a utilizat Irgacure într-o concentrație de 1%, adăugându-l în soluție (în condiții de lumină scăzută). Parametrii de fotoreticulare utilizați au inclus o perioadă de expunere de 60 de secunde, o intensitate a luminii de 30 mW și o lungime de undă de 365 nm. Pentru reticularea chimică, s-a utilizat o soluție de 2% CaCl₂, iar structurile au fost imersate în soluție timp de 10 minute.

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare

Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8


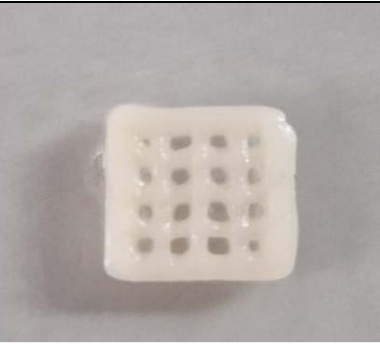
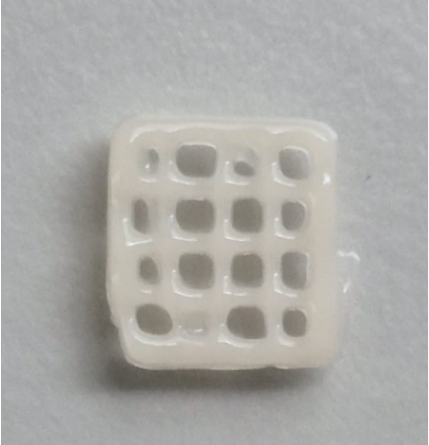
Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

Tabelul 1.3. Parametrii de lucru utilizați pentru formularea GelMA-pectină.

GelMA-pectină				
Tipul acului folosit	Presiune (kPA)	Viteza capului de printare (mm/s)	Imagini ale structurii printate	
25 G (0.5 mm diametru interior) 	470	3.5		
	460	3.5		

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare



Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

	455	3.5	
	455	3.0	

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare

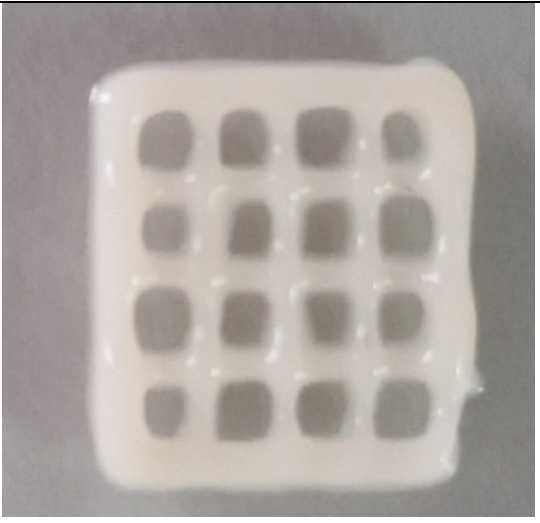
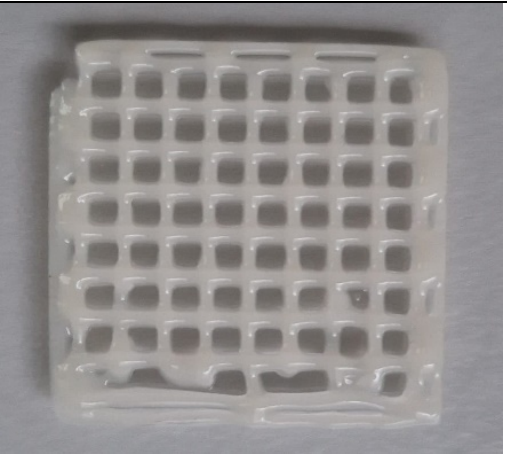
Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

	445	3.5	
	445	3	

Față de formularea în care s-a utilizat alginat, în acest caz, pectina a crescut vâscozitatea soluției, necesitând aplicarea unei presiuni mai mari pentru extrudarea filamentului. Conform

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare

Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

rezultatelor prezentate în tabelul 1.3, cea mai bună fidelitate de printare s-a obținut utilizând o viteză de 3 mm/s și o presiune de 445 kPa.

CAPITOL 1.2.

Sinteza de nanoplatforme de nitroceluloză (NC) cu grafenă redusă PEG-aminată

Nanoplatformele NC (membrane) au fost pregătite cu un diametru de 5 mm și o masă aproximativă de 1.1 mg, folosind un perforator de hârtie convențional. Modificarea necovalentă a nanoplatformei NC a fost realizată folosind o abordare asemănătoare tehnicii *dot blot*. Inițial, s-a preparat o dispersie diluată de NH₂-PEG-rGO la o concentrație de 400 μg/mL, iar un volum de 5 μL din această dispersie a fost ulterior aplicat pe membrana NC prin utilizarea unei micro-pipete. Înainte de a fi testate, nanoplatformele hibride NC/NH₂-PEG-rGO (figura 1.7) rezultate au fost lăsate să se usuce la aer peste noapte și au fost spălate cu apă deionizată.

Dispersia de grafenă redusă PEG-aminată a fost obținută la o concentrație de 1 mg/mL după 2 ore de ultrasonare într-o baie de gheață, folosind un sonicator VC×750 (Sonics & Materials, Inc., Newtown, CT, SUA). Acest echipament a funcționat la un impuls de 10 s urmat de o pauză de 5 s și o frecvență de 20 kHz.

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare

Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

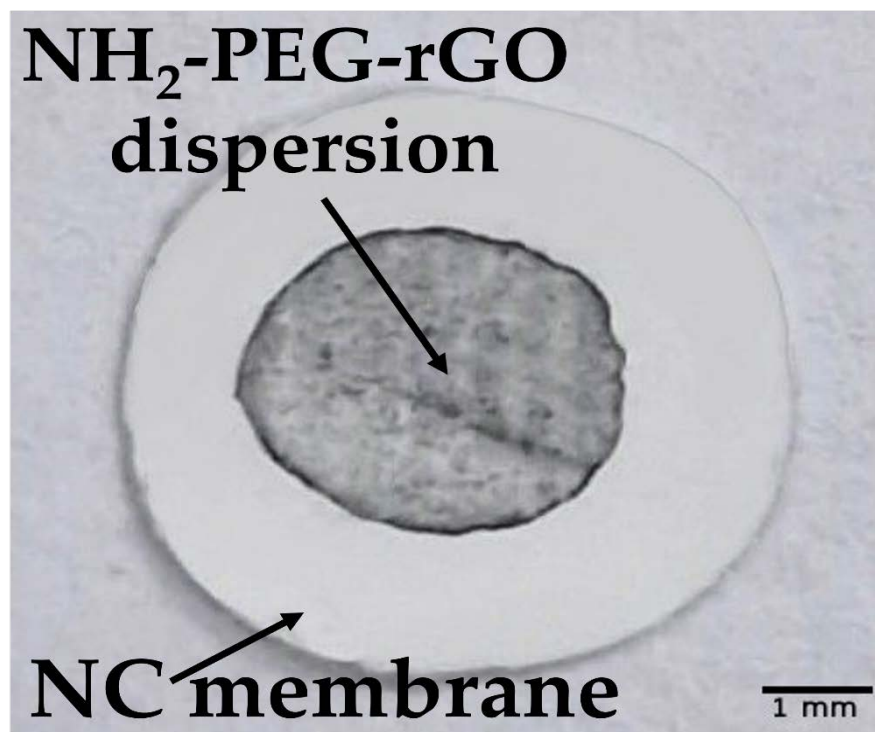


Figura 1.7. Nanoplatforma de nitroceluloză cu grafenă redusă PEG-aminată.

Sinteza de medii ionice complexe cu ASO pentru incubarea nanoplatformelor NC/NH₂-PEG-RGO.

Pentru acest studiu s-au folosit molecule ASO de ADN monocatenare cu secvența 5'-TTTCAACATCAGTCTGATAAGCTATCTCCC-3 și marcate fluorescent cu 6-carboxyfluorescein (FAM).

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare

Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

În prima parte a experimentelor au fost pregătite trei soluții ionice distincte pentru imobilizarea oligonucleotidelor ASO folosind mediu de cultură celulară Eagle cu limită inferioară (α MEM) ca mediu bază. Cele trei medii ionice conțin 100 mM $MnCl_2$, 100 mM $MgCl_2$ și, respectiv, o combinație de $MnCl_2/MgCl_2$. Aceste soluții au fost suplimentate cu 0.1 mg/mL albumină serică bovină (BSA), 10 mM Tris-HCl la pH 8.0, 0,1% dodecil sulfat de sodiu (SDS) și 16 nM de FAM-mADN (secvența ASO). Câte un volum de 100 μ L din soluțiile ionice obținute a fost adăugat în plăci Costar negre cu 96 de godeuri pentru fiecare experiment. În cazul testelor de adsorbție, au fost utilizate atât nouă nanoplatforme hibride NC/ NH_2 -PEG-rGO, cât și nouă nanoplatforme simple de NC pentru control (Figura 1.8, pasul 1). Fiecare membrană a fost incubată timp de 60 de minute în soluțiile ionice pregătite pentru a facilita adsorbția FAM-mADN (Figura 1.8, pasul 2).

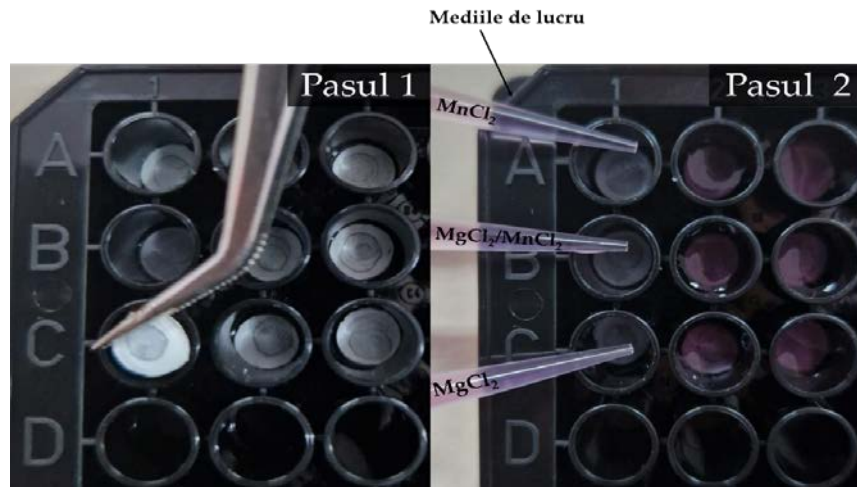


Figura 1.8. Pasul 1) Amplasarea celor 9 nanoplatforme utilizate pentru experiment în godeuri. Pasul 2) Incubarea nanoplatformelor în cele trei soluții ionice utilizate.

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare

Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

Pentru a elimina de pe suprafața membranei secvențele mADN nehibridizate, nanoplatformele au fost spălate cu apă distilată după incubare. Ulterior, nanoplatformele au fost incubate într-o soluție de Tris-HCl 10 mM, la pH 7.0, timp de 45 de minute, pentru a iniția procesul de desorbție a FAM-mADN. După îndepărtarea nanoplatformei hibride NC/NH₂-PEG-rGO, fluorescența soluției de desorbție a fost cuantificată cu ajutorul unui cititor de microplăci TECAN SPARK, la o lungime de undă de 535 nm (figura 1.9). În total s-au realizat 5 serii de astfel de experimente. Principiul de funcționare al aparatului se bazează pe excitarea moleculelor de FAM-mADN și captarea semnalelor emise de molecule după oprire (principiile FRET și PET). Astfel, aparatul măsoară fluorescența moleculelor de FAM-mADN din soluție în 5 puncte ale godeului, realizând automat media acestora și deviația standard, acestea fiind reprezentate ca unități relative de fluorescență în tabelul 1.4.



Figura 1.9. Fluorimetru - aparatul de măsurare al procesului optic de fluorescență (TECAN-SPARK).

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare

Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

Conform datelor experimentale obținute, prezentate în tabelul de mai jos, se poate observa faptul că cele mai multe molecule de FAM-mADN au fost desorbite de pe nanoplatformele hibride NC/NH₂-PEG-rGO cu valori de peste 300 unități relative de fluorescență (r.f.u.) față de nanoplatformele de control care nu au depășit 300 r.f.u.

Tabelul 1.4. Valorile intensității fluorescenței (r.f.u.) obținute în urma testelor optice.

	Cu grafenă aminată						Fara grafenă aminată membrană simplă (Control)				
	NC-GA	NC-GA	NC-GA	NC-GA	NC-GA		Mangan (Mn)				
	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
Fluorescența (r.f.u.)	299.8	351.2	302.2	387.6	365.2		218	245	242	208.8	249.4
Deviația standard	39.83968	47.46262	46.94891	49.66186	56.49956		33.08323	31.10466	30.89498	22.11787	28.99655
Fluorescența	265	304	251	328	311		190	215	212	187	220
în mai	309	379	338	399	402		237	272	269	221	268
multe	347	406	346	451	417		260	271	272	237	285
puncte	253	299	252	348	297		180	208	207	186	220
ale godeului	325	368	324	412	399		223	259	250	213	254
	Mangan (Mn)/ Magneziu (Mg)						Mangan (Mn)				
	NC-GA	NC-GA	NC-GA	NC-GA	NC-GA		NC	NC	NC	NC	NC
Fluorescența (r.f.u.)	392.6	458.2	367.8	425.4	410.4		252.2	249.4	253.6	259.6	244
Deviația standard	48.63435	73.01164	46.47257	59.59698	59.85232		29.43977	28.99655	29.36495	24.33721	29.58885
Fluorescența	346	384	346	358	333		223	220	222	240	216
în mai	395	459	381	460	434		274	268	276	278	261
multe	463	513	424	494	480		286	285	284	279	281
puncte	348	388	301	368	365		221	220	223	227	212
ale godeului	411	547	387	447	440		257	254	263	274	250
	Magneziu (Mg)						Magneziu (Mg)				
	NC-GA	NC-GA	NC-GA	NC-GA	NC-GA		NC	NC	NC	NC	NC
Fluorescența (r.f.u.)	540.6	532.8	543.4	504.8	537.4		268	260.2	274.2	280.8	273.8
Deviația standard	79.57575	71.49965	74.93531	71.68473	77.25477		41.62331	39.76431	31.05157	34.16431	29.75231
Fluorescența	460	444	469	422	455		234	232	252	249	243
în mai	573	571	556	511	567		310	292	292	310	282
multe	645	611	646	574	632		303	307	307	309	318
puncte	461	471	471	442	460		216	212	232	239	250
ale godeului	564	567	575	575	573		277	258	288	297	276

Mecanismul de adsorbție este explicat de efectul de stingere (*quenching* - Figura 1.10). Fenomenul de "quenching" sau stingere înseamnă reducerea sau pierderea intensității

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare

Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

fluorescenței datorită unui proces care implică interacțiunea cu o altă substanță. În contextul adsorbției FAM-mADN pe nanoplatforme de NC/NH₂-PEG-rGO poate avea mai multe explicații posibile.

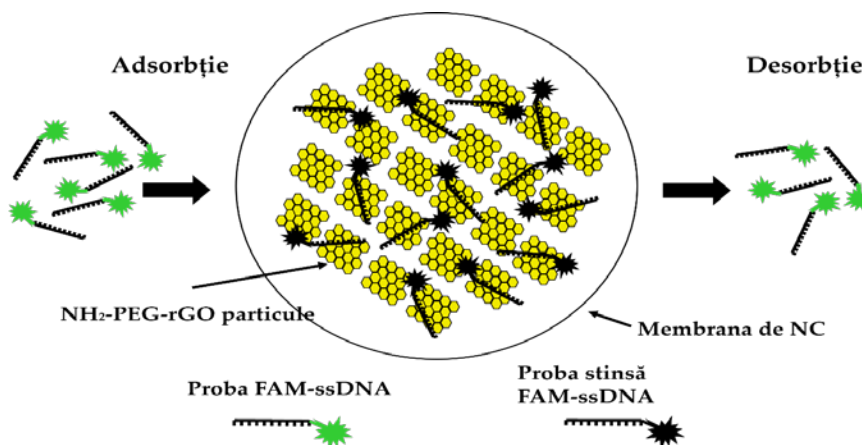


Figura 1.10. Fenomul de stingere (quenching) produs de nanoplatformele hibride NC/NH₂-PEG-rGO asupra moleculelor FAM-mADN.

Grafena redusă are proprietăți excelente de *quenching* datorită structurii sale ce conține grupări funcționale încărcate electronegativ. Astfel, efectul de stingere al FAM-mADN-ului este determinat de adsorbția sa pe nanoplatforma NC/NH₂-PEG-rGO, prin diferite interacțiuni: legături de hidrogen, interacțiuni π - π și interacțiuni electrostatice.

Pe de altă parte, conform tabelului 1.4, există și o diferență între mediile ionice folosite pentru adsorbția FAM-mADN, astfel cele mai bune rezultate fiind obținute în mediile în care se aflau ioni de magneziu. În mediile cu Mg²⁺, cele mai mari valori au ajuns până la 550 r.f.u. față de mediile cu Mn²⁺, unde cea mai mare valoare a ajuns la aproximativ 390 r.f.u., indicând astfel, faptul că mediile cu Mg²⁺ au susținut legarea unor concentrații mai mari de FAM-mADN.

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare

Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

Concluzii

În concluzie, prin intermediul acestor experimente de laborator, în prima parte s-a dezvoltat elaborarea unor protocoale de sinteză pentru formulări printabile, atât pe bază de GelMA-alginat și grafenă aminată, cât și GelMA-pectină. Optimizarea parametrilor de printare pentru aceste formulări a condus la obținerea unor modele 3D similare cu modelul CAD de referință. Astfel, în cazul GelMA-alginat, cea mai bună fidelitate de printare s-a obținut utilizând un ac cu dimensiunea de 25G, o presiune de 295 kPa și o viteză cuprinsă între 3.3 și 3.5 mm/s. Pentru GelMA-alginat cu 0.125% grafenă aminată, cele mai bune rezultate au fost obținute prin utilizarea aceluiași ac de dimensiunea 25G, o presiune de 280 kPa și o viteză de printare de 4 mm/s. În ceea ce privește formularea GelMA-pectină, cea mai mare fidelitate de printare s-a obținut prin folosirea unei presiuni de 445 kPa, o viteză de printare de 3 mm/s și aceluiași ac de dimensiune 25G. Prin urmare, abordarea meticuloasă și optimizarea atentă a parametrilor de printare au facilitat obținerea unor modele 3D de înaltă calitate, reflectând fidelitatea și precizia dorită în procesul de fabricare.

În a doua parte a experimentelor s-a realizat sinteza de nanoplatforme de nitroceluloză cu grafenă redusă PEG-aminată. Aceste nanoplatforme au fost incubate în soluții ionice pentru adsorbția și desorbția moleculelor ASO de ADN monocatenar marcat fluorescent. Cele mai bune rezultate s-au obținut pe de-o parte pentru nanoplatformele cu grafenă aminată, iar pe de altă parte pentru medii ionice cu Mg^{2+} .

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare

Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

PARTEA a II-a

Osul este un țesut complex cu proprietăți mecanice remarcabile, care îi conferă rezistență și flexibilitate. Aceste proprietăți includ rezistența la tracțiune, compresiune și flexibilitatea necesară pentru a susține funcțiile variate ale corpului uman. Atunci când este vorba de înlocuitori osoși, este necesar ca aceștia să reproducă fidel aceste caracteristici mecanice pentru a asigura integrarea optimă în organism și funcționarea corectă a sistemului osos. Proiectul REOSTEMi utilizează tehnici de printare 3D pentru a realiza aceste tipuri de înlocuitori osoși care să imite cu precizie proprietățile mecanice ale osului natural, oferind astfel soluții eficiente și adaptabile pentru regenerarea țesuturilor osoase afectate.

Totodată, proiectul REOSTEMi vizează și studierea moleculelor ASO pentru tratarea bolilor asociate MM. Moleculele ASO modifică expresia genetică anormală sau excesivă care stă la baza bolii, deschizând astfel noi căi terapeutice pentru tratarea acestor afecțiuni complexe. Analiza moleculelor ASO în cadrul proiectului REOSTEMi reprezintă un pas important către dezvoltarea unor tratamente personalizate și mai eficiente pentru pacienții afectați de MM și alte boli asociate acestuia.

Astfel, în cadrul acestui studiu, au fost efectuate experimente pentru a dezvolta înlocuitori osoși personalizați capabili să reproducă caracteristicile mecanice ale osului. A fost utilizată tehnologia avansată de bio-printare 3D, care implică formularea de cerneluri compozite integrate cu nanomateriale pe bază de grafenă aminată (GA), grafenă carboxilată (GC) și o combinație între aceste două tipuri. În crearea acestor formulări, s-a acordat o atenție deosebită sinergiilor

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare

Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

dintre gelatină (G), gelan (GG), nanofibre de celuloză și agenții utilizați pentru reticulare, cum ar fi genipinul și clorura de calciu.

De asemenea, s-au realizat studii asupra nanoplatformelor de nitroceluloză cu grafenă redusă PEG aminată în ceea ce privește cinetica de adsorbție și desorbție a moleculelor ASO de ADN, pe baza rezultatelor obținute în luna precedentă. Nanoplatforme au fost analizate atât din punct de vedere morfologic (înainte și după experimente), utilizând microscopia electronică de baleiaj (SEM), cât și din punct de vedere structural, utilizând tehnica FTIR. Totodată, nanoplatforme au fost testate și în ceea ce privește hidrofobicitatea/hidrofilicitatea acestora, prin analiza unghiului de contact cu apa.

Materiale și Metode:

CAPITOL 2.1.

Sinteza formulărilor compozite pe bază de gelatină, gelan, nanofibre de celuloză și materiale grafenice.

Sinteza formulărilor compozite a implicat utilizarea nanofibrelor de celuloză ca bază, acestea fiind dispersate prin ultrasonare împreună cu GA, GC și GA/GC. Fiecare soluție a fost supusă procesului de ultrasonare timp de 4 ore, cu amplitudinea vibrațiilor vârfului sondei ajustată la 30% pe durata întregii proceduri. Impulsurile vibraționale au fost generate la intervale de 5 secunde, cu un timp de emisie de 15 secunde. Parametrii aceștia sunt detaliați în figura 2.1, pe interfața aparatului VCX 750, produs de firma Sonics & Materials, Inc. din Newton, CT, SUA. După dispersarea materialelor, s-a adăugat cantitatea corespunzătoare de GG, conform

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare

Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

tabelului 2.1, menținând soluțiile la o temperatură de peste 75 °C, optimă pentru solubilizarea completă a acesteia.



Figura 2.1. Parametri de lucru pentru dispersarea nanofibrelor de celuloză și a nanomaterialelor grafenice.

Următorul pas a constat într-o reducere rapidă a temperaturii soluției până la 40 °C, prin intermediul utilizării unei băi de gheață, înainte de adăugarea gelatinei, cu scopul de a preveni orice risc de denaturare a acesteia. În final, s-a introdus genipinul, un agent de reticulare care stabilește legături covalente între moleculele de gelatină. Prin interacțiunea genipinului cu grupările amino ale gelatinei, are loc o reacție chimică prin care se formează legături covalente între aceste grupări.

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare

Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

Tabelul 2.1. Prezentarea compozițiilor materialelor.

	Nanofibre celuloză (C)	Nanomateriale grafenice (GA/GC % în funcție de cantitatea de polimer)	Gellan- Gum (GG)	Gelatină (G)	Genipin din gelatină
C-G-GG_Control	20 ml	0 %	0.4 g	1.6 g	1%
C-G-GG_GA	20 ml	0.5 %	0.4 g	1.6 g	1%
C-G-GG_GC	20 ml	0.5 %	0.4 g	1.6 g	1%
C-G-GG_GA/GC	20 ml	0.25 %/0.25 %	0.4 g	1.6 g	1%

Compozițiile obținute au fost turnate în plăcuțe Petri lăsate timp de 12 ore la temperatura camerei, pentru a favoriza procesul de reticulare. După acest interval, probele au căpătat o nuanță albastră, indicând reticularea completă a blendelor polimerice compozite.

Pentru realizarea testelor mecanice - compresiune, tracțiune și forfecare, probele au fost pregătite sub diferite forme (figura 2.2). Pentru compresiune a fost necesară pregătirea probelor într-o formă pătratică pentru ca acestea să fie conforme cu cerințele testului.

Pentru testele de tracțiune, probele au fost pregătite sub formă de structuri lungi și subțiri, asigurând astfel condițiile optime pentru evaluarea rezistenței la tracțiune. În ceea ce privește testele de forfecare, probelor li s-au conferit forme adecvate pentru a permite măsurarea corespunzătoare a rezistenței în acest context.

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare

Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

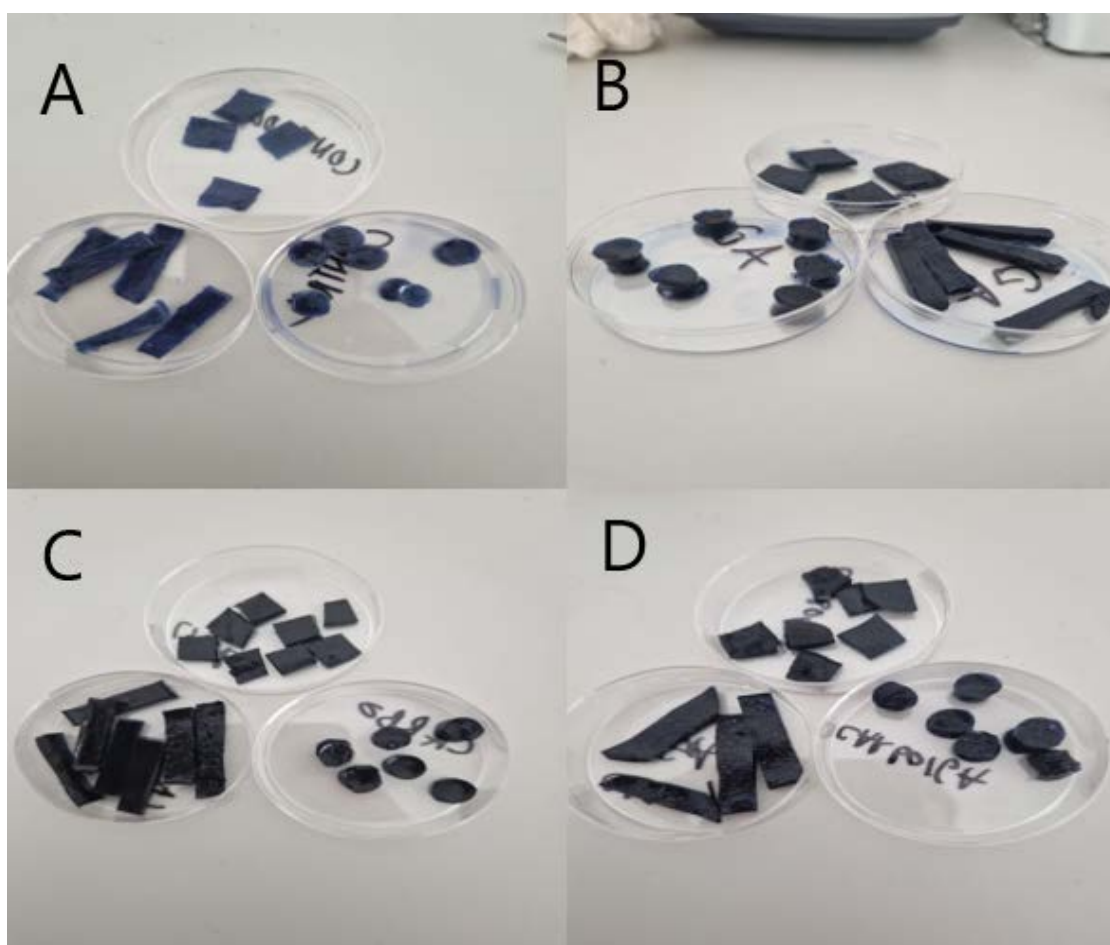


Figura 2.2. Pregătirea probelor pentru testele mecanice: A) C-G-GG -control, B) C-G-GG _GA, C) C-G-GG -GC și D) C-G-GG _GA/GC.

În Figura 2.3 sunt ilustrate o serie de imagini din timpul testelor mecanice care detaliază în mod specific procesele de compresiune și tracțiune.

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare

Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

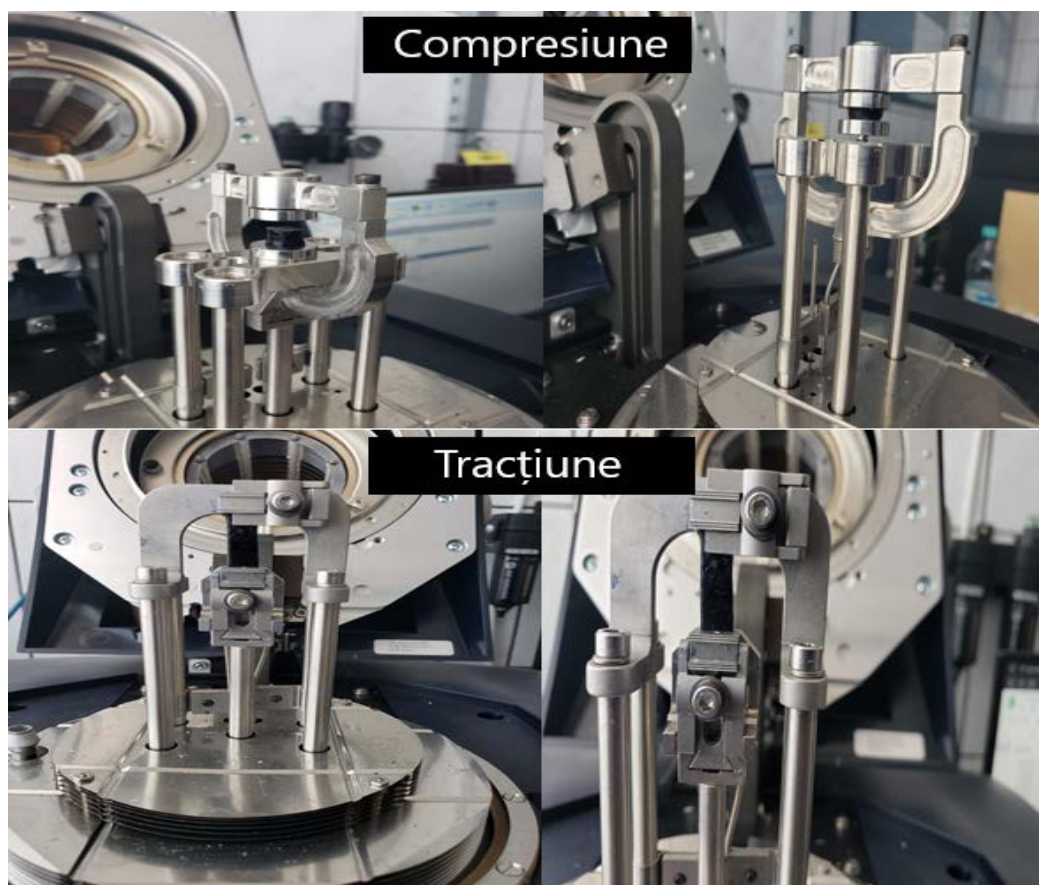


Figura 2.3. Imagini din timpul testărilor mecanice de compresiune și tracțiune a formulărilor compozite.

În urma testelor mecanice de compresiune pentru cele 4 formulări, s-au obținut rezultate ilustrate în graficele prezentate în Figura 2.4. Conform acestor grafice, care prezintă rezistența la compresiune, sau mai exact curbele de efort-deformare, se poate observa că, prin adăugarea unui conținut de grafenă, rezistența la compresiune a suporturilor realizate a crescut semnificativ în comparație cu probele de control.

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare

Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

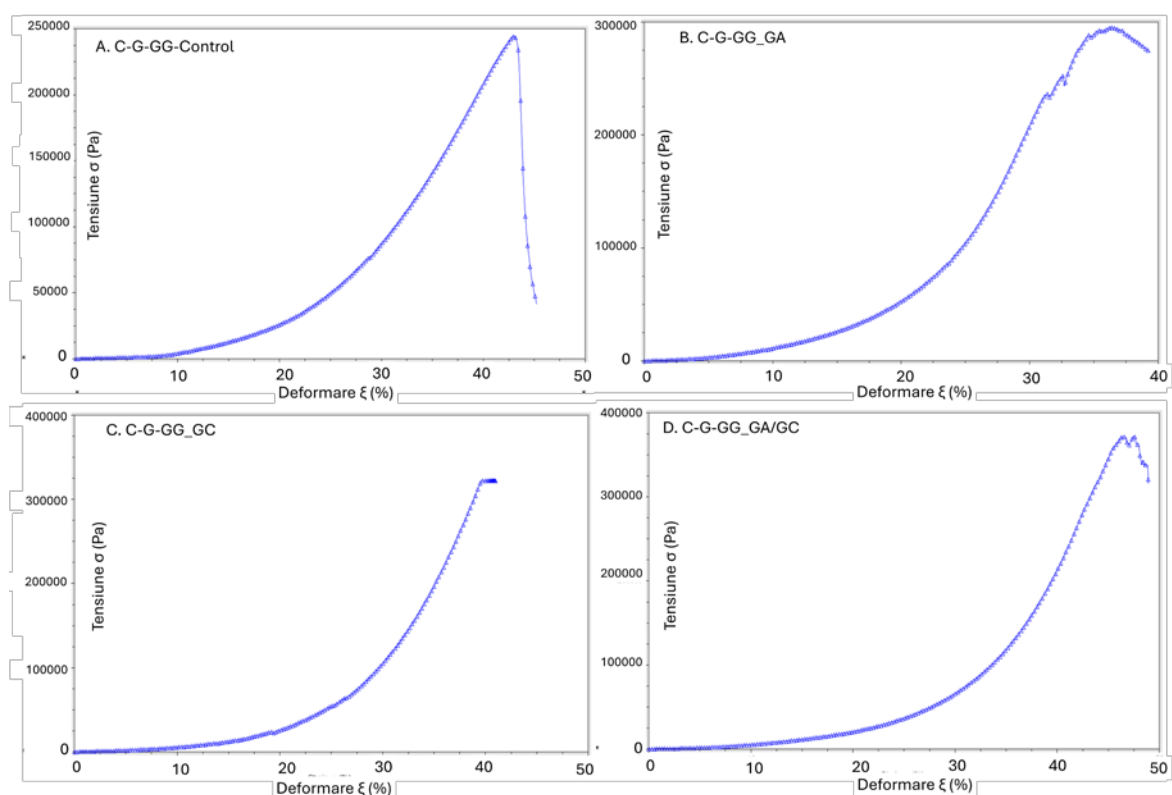


Figura 2.4. Curbele de tensiune-deformare pentru cele 4 formulări compozite A. C-G-GG - control, B. C-G-GG_GA, C. C-G-GG -GC și D. C-G-GG_GA/GC.

Pentru C-G-GG_Control, rezistența la compresiune a atins valoarea de 0.25 MPa, în timp ce prin adăugarea grafenei aminate, C-G-GG_GA a demonstrat o creștere notabilă, atingând 0.29 MPa. C-G-GG_GC, cu grafenă carboxilată, a prezentat o rezistență la compresiune mai ridicată, cu o valoare de 0.33 MPa. Cea mai mare rezistență la compresiune a fost atinsă de formularea C-

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare

Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

G-GG_GA/GC, rezultată din combinarea grafenei aminate cu cea carboxilată, indicând o valoare de 0.38 MPa.

O explicație pentru acest efect sinergic al formulării cu grafenă aminată/carboxilată constă în faptul că cele două tipuri de grafenă au roluri distincte, contribuind atât la consolidarea matricei, cât și la îmbunătățirea distribuției uniforme a tensiunii. Pe de o parte, grafena aminată și grafena carboxilată pot avea structuri moleculare complementare care, atunci când sunt combinate, conduc la o structură mai complexă și robustă. Acest aspect poate contribui la o distribuție mai uniformă a tensiunii și poate împiedica deformările excesive în compresie.

Pe de altă parte, combinarea celor două tipuri de grafenă poate contribui la o distribuție mai uniformă a particulelor de grafenă în matricea compozită. Aceasta poate evita formarea de aglomerări și poate asigura o acoperire uniformă a întregii suprafețe a compozitului, conducând la o rezistență crescută la compresie.

Astfel, interacțiunile chimice și fizice între grafena aminată și cea carboxilată pot genera contribuții sinergice la structura compozitului, consolidând matricea și crescând rezistența la compresie.

În cazul testelor de tracțiune, în figura 2.5 se pot observa valorile obținute. Compozitul C-G-GG_control a demonstrat o rezistență la tracțiune de 110000 Pa, în timp ce grafena aminată (C-G-GG_GA) a prezentat o valoare mai redusă de 60000 Pa, indicând modificări semnificative atât în structura, cât și în interacțiunile materialelor componente.

Adăugarea grafenei carboxilate în formularea printabilă (C-G-GG_GC) a condus la o îmbunătățire semnificativă a rezistenței la tracțiune, cu o valoare maximă de 130000 Pa, subliniind contribuția interacțiunilor chimice la proprietățile mecanice ale compozitului.

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare

Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

Combinăția sinergică dintre grafena aminată și cea carboxilată a generat cea mai mare valoare a rezistenței la tracțiune de 210000 Pa, evidențiind importanța optimizării interacțiunilor din matricea compozită. Aceste rezultate nu numai că subliniază importanța compoziției, ci și interdependența dintre proprietățile chimice și mecanice ale compuşilor compoziți.

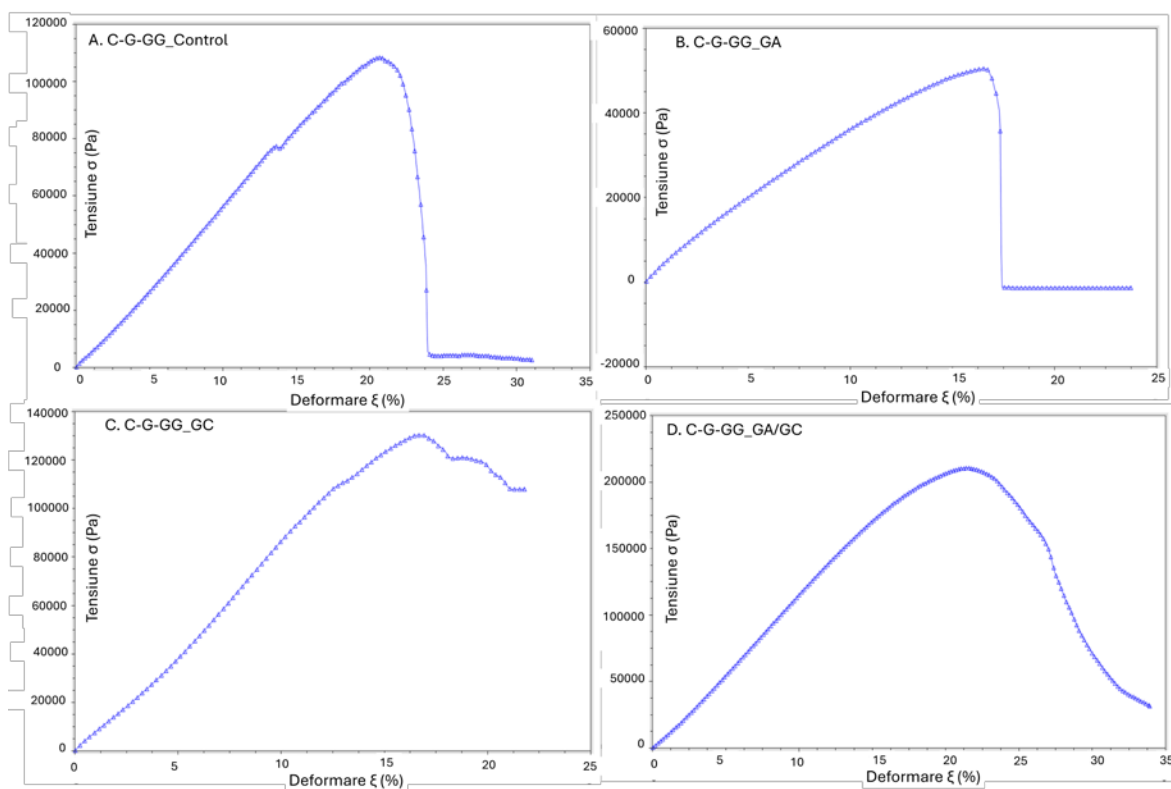


Figura 2.5. Curbele de tracțiune pentru cele 4 formulări compozite A. C-G-GG _Control, B. C-G-GG _GA, C. C-G-GG -GC și D. C-G-GG _GA/GC.

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare

Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

Testele mecanice de forfecare pot fi observate în figura 2.6. În Figura 2.6 A (C-G-GG_CONTROL), este ilustrat comportamentul compozitului din punct de vedere al modulelor de stocare (G') și de pierdere (G''). Valorile obținute indică o rigiditate sau rezistență mai scăzută, dată fiind diferența dintre cele două module.

Hidrogelurile sunt caracterizate printr-un modul de stocare (G') mai mare decât modulul vâscos (G''). În Figura 2.6 B, compozitul C-G-GG_GA prezintă valori mai mari ale acestor module. Adăugarea grafenei aminatate îmbunătățește rigiditatea materialului, făcându-l mai rezistent la deformare.

În Figura 2.6 C, compozitul C-G-GG_GC are valori între cele ale C-G-GG_CONTROL și C-G-GG_GA pentru cele două module. În acest caz, modulul de pierdere are valori mai ridicate decât modulul de stocare, conducând la o comportare predominant vâscoasă a materialului.

În Figura 2.6 D, compozitul C-G-GG_GA/GC prezintă valori ridicate ale acestor module. Prezența simultană a grafenei aminatate și a celei carboxilate conferă materialului o rigiditate crescută.

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare

Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

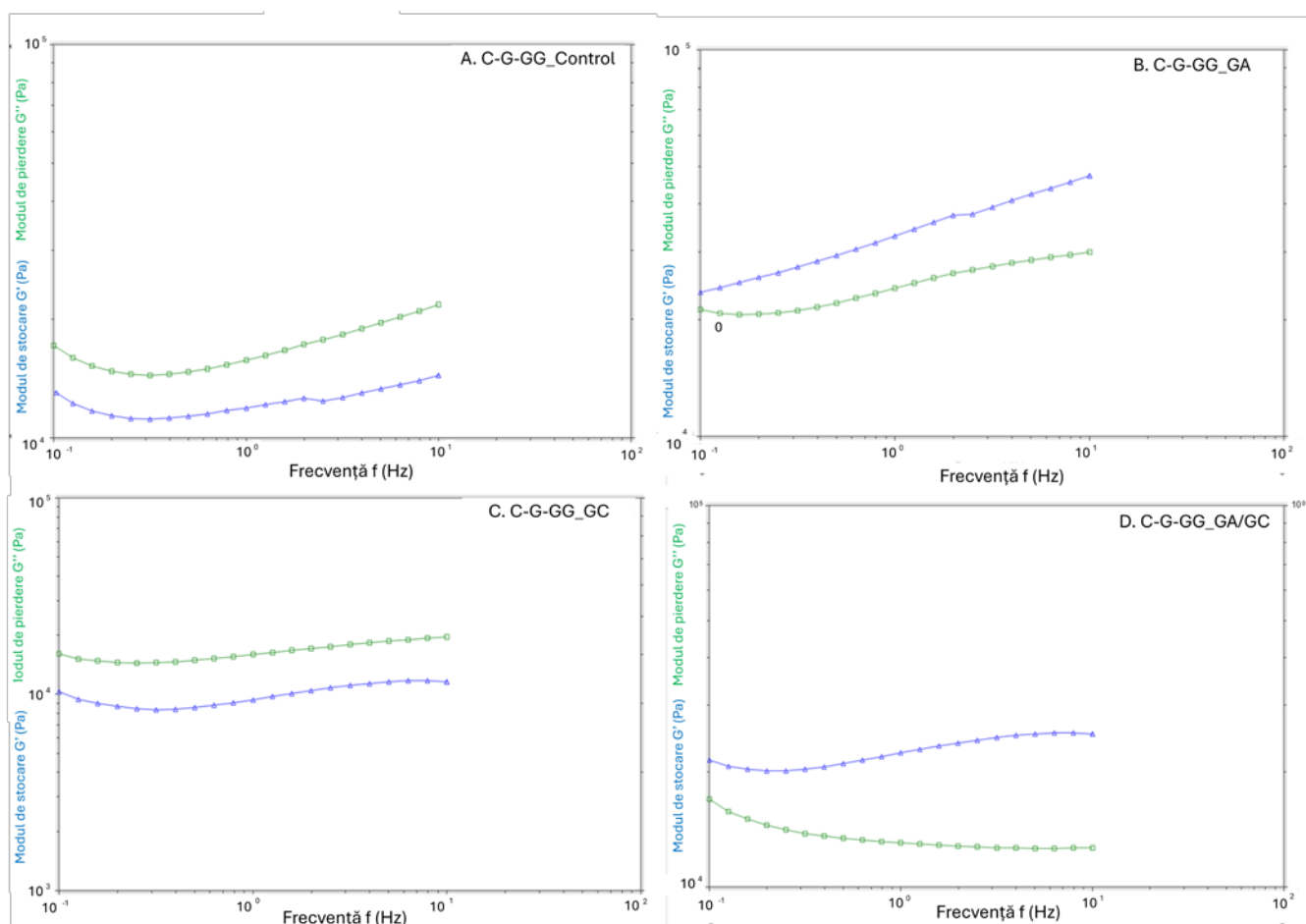


Figura 2.6. Testele mecanice de forfecare pentru cele 4 formulări compozite A. CGG_Control, B. CGG_GA, C. CGG-GC și D. CGG_GA/GC.

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare

Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

Astfel, în urma testelor de compresiune, tractiune și forfecare, rezultatele au evidențiat îmbunătățirea proprietăților mecanice ale formulării nanocompozite prin adăugarea de grafenă. În testele menționate anterior, formularea nanocompozită C-G-GG_GA/GC a oferit cele mai bune rezultate subliniind sinergia dintre cele două tipuri de grafenă folosite. Grupările aminate și carboxilate ale grafenei pot facilita formarea de legături chimice covalente, consolidând astfel structura materialului și contribuind la creșterea rezistenței mecanice. De asemenea, rezultatele obținute pentru C-G-GG_GA/GC sunt comparabile cu cele ale osului trabecular. Ca referință, rezistența la compresiune a osului trabecular se situează în intervalul de 0.1-16 MPa [1, 2]. Aceste rezultate sugerează că nanocompozitul C-G-GG_GA/GC ar putea fi o opțiune promițătoare pentru dezvoltarea de înlocuitori osoși.

Bibliografie:

[1] Gerhardt, Lutz-Christian & Boccaccini, Aldo. (2010). Review – Bioactive Glass and Glass-Ceramic Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Materials*. 3. 10.3390/ma3073867.

[2] Pepe Valentina, Oliviero Sara, Cristofolini Luca, and Dall'Ara Enrico "Regional Nanoindentation Properties in Different Locations on the Mouse Tibia From C57BL/6 and Balb/C Female Mice" in *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, VOLUME=8, year 2020, DOI=10.3389/fbioe.2020.00478

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare

Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

CAPITOL 2.2.

Analize și studii asupra cineticii de adsorbție-desorbție a moleculelor ASO de ADN monocatenar asupra nanoplatformelor cu grafenă redusă PEG-aminată.

Pentru a se studia relevanța rezultatelor (tabelul 1.4 din PARTEA I) aferente adsorbției și desorbției moleculelor ASO de ADN obținute în studiile optice de fluorimetrie din prima parte a raportului științific, este necesară urmarea mai multor pași de prelucrare a datelor.

Un prim pas constă în calcularea atât a mediei aritmetice a valorilor intensității fluorescenței nanoplatformelor, cât și a abaterii standard cumulate, care se referă la suma abaterilor standard individuale ale unor seturi de date. Mai mult, aceasta este o medie ponderată a deviației standard a fiecărui grup (în cazul nostru pentru fiecare membrană în parte).

Ponderarea conferă grupurilor mai mari un efect proporțional mai mare asupra estimării globale. Aceasta se calculează folosind formula din figura 2.7. Rezultatele obținute se pot observa în tabelul 2.2.

Pooled standard deviation formula

$$Pooled\ SD = \sqrt{\frac{(SD_1^2 + SD_2^2)}{2}}$$

Figura 2.7. Formula deviației standard cumulate.

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare

Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

Un al doilea pas conform tabelului 2.2 este obținerea erorii medii standard (EMS) care măsoară probabilitatea discrepantei existente dintre o valoare unitară de fluorescență și media totală a rezultatelor. Prin urmare EMS împarte deviația standard la radicalul valorii fluorescenței unei singure nanoplatforme. Astfel, prin aplicarea formulei (7), s-au obținut rezultatele EMS din tabelul 2.2.

Tabelul 2.2. Media aritmetică și deviația standard cumulată pentru valorile fluorescenței emise de moleculele ASO de ADN în urma proceselor de adsorbție și desorbție.

		Media aritmetică			
		Mangan (Mn)			
NC-GA	SD (Deviație standard)	NC	SD (Deviație standard)		
341.2	48.37892103	232.64	29.48389391		
SEM		SEM			
21.63571122		13.1855982			
		Mangan (Mn)/ Magneziu (Mg)			
NC-GA	SD (Deviație standard)	NC	SD (Deviație standard)		
410.88	58.29202347	251.76	28.41689638		
SEM		SEM			
26.0689854		12.7084224			
		Magneziu (Mg)			
NC-GA	SD (Deviație standard)	NC	SD (Deviație standard)		
531.8	75.05571264	271.4	35.58173689		
SEM		SEM			
33.56593511		15.91263649			

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare

Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

Ultimul pas a inclus aplicarea T-testului care indică relevanța rezultatelor obținute în cadrul experimentelor. Acesta se calculează punând media valorilor celor două tipuri de nanoplatforme, apoi ESM, iar în final n-ul, ce reprezintă numărul de experimente (n=5). Valorile sunt considerate semnificative dacă acestea sunt sub valoarea de 0.05. Un exemplu de calculare al acestui test statistic se poate observa în figura 2.8.

T test calculator

A t test compares the means of two groups. There are several types of two sample t tests and this calculator focuses on the three most common: unpaired, welch's, and paired t tests. Directions for using the calculator are listed below, along with more information about two sample t tests and help on which is appropriate for your analysis.
NOTE: This is not the same as a one sample t test: for that, you need this [One sample t test calculator](#).

1. Choose data entry format
Caution: Changing format will erase your data.

- Enter up to 50 rows
- Enter or paste up to 2000 rows
- Enter mean, SEM and N
- Enter mean, SD and N

2. Choose a test
[Help me choose](#)

- Unpaired t test
- Welch's unpaired t test (used rarely)

(You can only choose a paired t test if you enter individual values.)

3. Enter data
[Help me arrange the data](#)

Label:	<input type="text" value="NC-GA+Mangan"/>	<input type="text" value="NC+Mangan"/>
Mean:	<input type="text" value="341,2"/>	<input type="text" value="232,64"/>
SEM:	<input type="text" value="21,63"/>	<input type="text" value="13,19"/>
N:	<input type="text" value="5"/>	<input type="text" value="5"/>

4. View the results

Figura 2.8. Calcularea relevanței statistice pentru nanoplatformele din mediile cu ioni de mangan.

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare

Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

Astfel, conform rezultatelor testelor statistice T-test din figura 2.9, se poate observa că toate măsurătorile sunt relevante din punct de vedere statistic, având valori sub 0.05, mai exact 0.0027, 0.0006 și 0.0001.

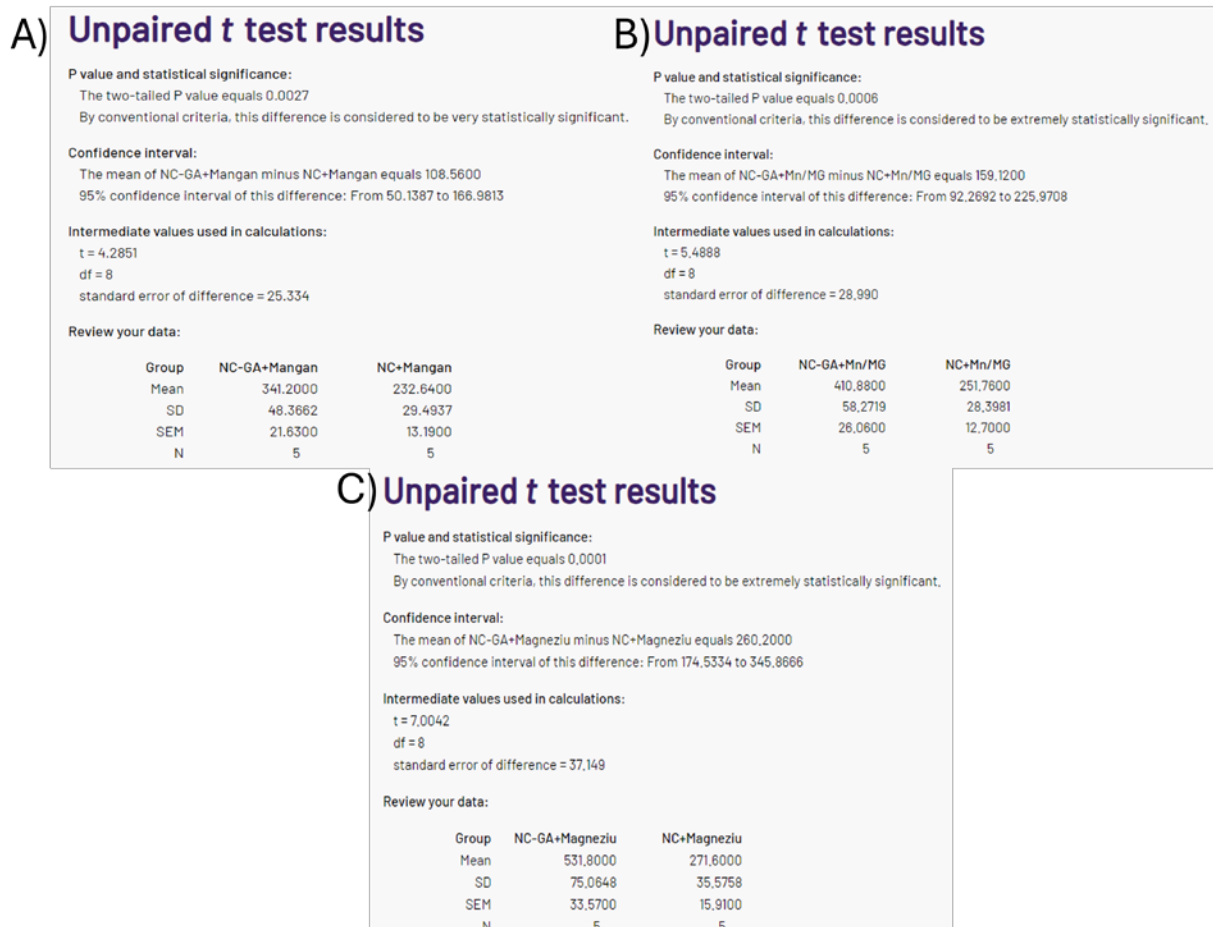


Figura 2.9. Rezultatele testelor statistice t-test aferente celor două nanoplatforme din cele trei medii complexe cu ioni de (A) mangan, (B) magneziu/mangan și (C) magneziu.

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare

Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

Studii asupra cineticii de adsorbție și desorbție ale ASO de mADN pe nanoplatformele cu grafenă redusă PEG-aminată

Pentru a evalua influența diferitelor săruri ($MnCl_2$, $MnCl_2/MgCl_2$, $MgCl_2$) asupra eficienței nanoplatformelor hibride NC și NC/NH_2 -PEG-rGO în detectarea și extragerea mADN, am măsurat intensitatea fluorescenței după incubarea nanoplatformelor timp de 60 de minute în medii complexe. Datele rezultate sunt prezentate în Figura 2.10.

În cazul nanoplatformei NC, nu există diferențe semnificative în intensitatea fluorescenței între toate mediile complexe conținând săruri $MnCl_2/MgCl_2$ și $MgCl_2$, cu cea mai mare fluorescență înregistrată la aproximativ 280-290 r.f.u. Pe de altă parte, pentru nanoplatformele hibride NC/NH_2 -PEG-rGO, măsurătorile indică o afinitate semnificativ mai mare pentru immobilizarea mADN în soluția complexă conținând săruri de $MgCl_2$, cu o intensitate a fluorescenței de aproximativ 525 r.f.u. În contrast, soluția complexă conținând sărurile de $MnCl_2$ prezintă o afinitate mai mică, cu o intensitate a fluorescenței de aproximativ 330 r.f.u.

Chiar dacă această afinitate este mai mică decât cea observată cu sărurile de $MgCl_2$, demonstrează totuși capacitatea nanoplatformei de a interacționa cu mADN în diferite condiții față de membrana NC.

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare

Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

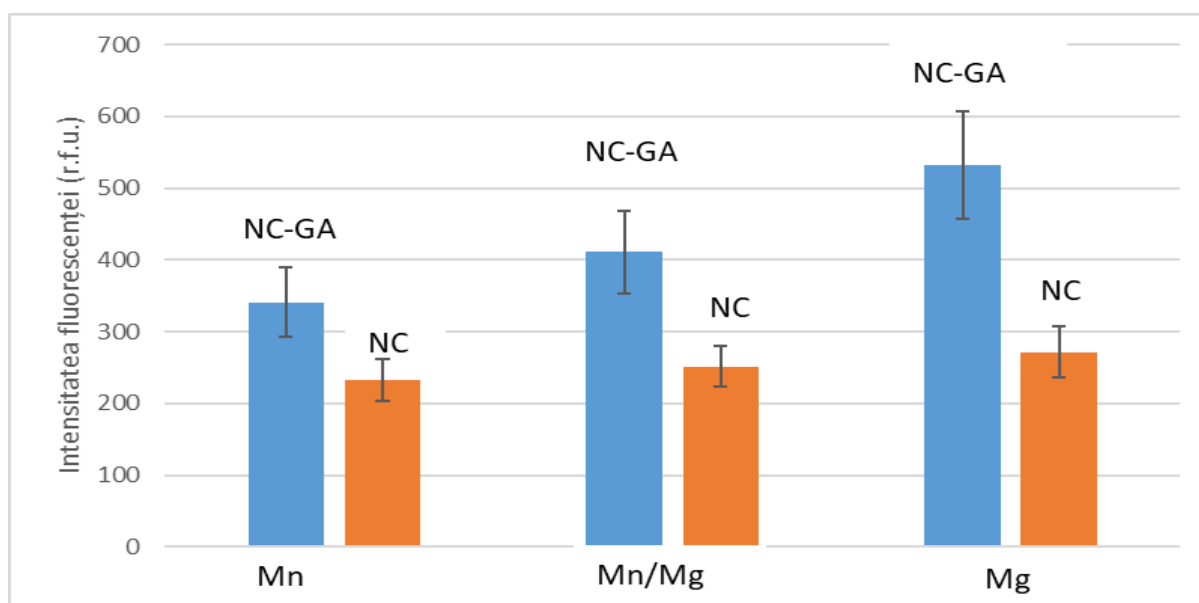


Figura 2.10. Rezultatele intensității fluorescenței FAM–mADN după 60 de minute de incubare a nanoplatformelor NC și NC/NH₂-PEG-rGO în soluții complexe cu diferite săruri (MnCl₂, MnCl₂/MgCl₂ și MgCl₂).

Cationii divalenți Mn²⁺ și Mg²⁺ din soluțiile complexe pot îmbunătăți interacțiunile hidrofobe între mADN și regiunile hidrofobe ale nanoplatformelor NC/NH₂-PEG-rGO. Acest lucru se datorează capacității cationilor divalenți de a promova condensarea ADN-ului, reducând expunerea la solvent și promovând interacțiunile cu suprafețele hidrofobe. De asemenea, acești cationi neutralizează eficient sarcinile negative de-a lungul ADN-ului, permițând astfel mADN să se apropie de suprafața nanoplatformei, facilitând immobilizarea acestuia. Mai mult decât atât, MnCl₂ și MgCl₂ pot crea zone specifice de legare pe suprafața nanoplatformelor, îmbunătățind

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare

Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

immobilizarea mADN într-un mod specific zonei și stabilizându-i structurile secundare și terțiare. Aceste interacțiuni îmbunătățesc afinitatea pentru legarea de nanoplatformă și, prin urmare, adsorbția globală a mADN-ului pe nanoplatformă.

Diverse componente, inclusiv proteinele serice găsite în α MEM, în special BSA și SDS, au rol în reducerea legării nespecifice a mADN la diverse suprafețe din mediul de cultură, în timp ce promovează aderența acestuia la nanoplatformă. BSA acționează ca o barieră de protecție, protejând moleculele de mADN încărcate negativ împotriva interacțiunilor electrostatice repulsive cu NC/NH₂-PEG-rGO, în timp ce SDS dezactivează nucleazele și reglează adsorbția nespecifică pe suprafața nanoplatformelor hibride NC/NH₂-PEG-rGO. În plus, α MEM încorporează glucoză și alți carbohidrați, crescând presiunea osmotică a soluției, ceea ce poate îmbunătăți adsorbția mADN pe suprafața nanoplatformei.

Rolul pH-ului în modularea interacțiunilor dintre mADN și nanoplatformă este un aspect critic al înțelegerii dinamicii lor de legare. Adăugarea de Tris-HCl, pH 8, conduce la alcanizarea mediului, ceea ce favorizează interacțiunile electrostatice de atracție între mADN și nanoplatformă, facilitând adsorbția mADN. Pe de altă parte, la utilizarea Tris-HCl, pH 7, mediul devine ușor acid, ceea ce reduce interacțiunile electrostatice dintre mADN și nanoplatformă, favorizând desprinderea sau desorbția mADN de pe nanoplatformă.

Transformarea valorilor de fluorescență (r.f.u.) în valori de masă (pg)

Utilizând ecuația 2.1, valorile rezultate au fost transformate în unități de masă și prezentate în tabelul 2.3. M_f denotă masa finală în picograme (pg) a FAM-mADN eliberat, F_f semnifică fluorescența finală în r.f.u. după procedura de desorbție. M_i reprezintă masa inițială a

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare

Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

FAM–mADN în soluția complexă (aproximativ 4420 pg), care a fost determinată folosind "Greutatea moleculară și conversia ADN-ului" disponibilă prin intermediul instrumentelor digitale puse la dispoziție de ThermoFisher. În cele din urmă, F_i denotă fluorescența soluției în r.f.u. după introducerea secvenței FAM–mADN (aproximativ 3800 r.f.u.).

$$M_f = \frac{F_f * M_i}{F_i} \quad (2.1.)$$

Astfel, în tabelul 2.3 este ilustrată cantitatea (pg) de mADN desorbită din nanoplatformele hibride NC și NC/NH₂-PEG-rGO după 60 de minute de adsorbție în cele trei medii complexe conținând MnCl₂, MnCl₂/MgCl₂ și, respectiv, MgCl₂. Pentru membrana NC nu există diferențe semnificative în masa desorbită între sărurile utilizate, cu valori cuprinse între 285 pg pentru MnCl₂ și 300 pg pentru MgCl₂. În schimb, pentru nanoplatformele hibride NC/NH₂-PEG-rGO, cea mai mare cantitate de masă desorbită a fost observată în cazul MgCl₂, aproximativ 610 pg, în timp ce cea mai mică a fost înregistrată în cazul MnCl₂, cu aproximativ 390 pg. Aceste constatări sugerează că, în medie, se desoarbe o cantitate mai mare de mADN din nanoplatformele hibride NC/NH₂-PEG-rGO în comparație cu membrana NC.

Acest rezultat contrastant poate fi atribuit faptului că ionii Mg²⁺ sunt mai mici decât ionii Mn²⁺, ceea ce le permite să neutralizeze mai eficient sarcinile negative ale moleculei de mADN. Această neutralizare îmbunătățită a sarcinii reduce respingerea electrostatică dintre mADN și suprafața nanoplatformei încărcată negativ, favorizând astfel adsorbția mADN pe nanoplatformă.

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare

Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

În plus, dimensiunea mai mică a ionilor Mg^{2+} îi ajută să acceseze și să interacționeze mai eficient cu zonele de legare de pe membrană, îmbunătățind astfel eficiența lor de legare.

Atât ionii Mg^{2+} , cât și cei Mn^{2+} sunt cationi divalenți, însă ionii Mg^{2+} au o densitate de sarcină mai mare decât Mg^{2+} . Această densitate de sarcină mai mare duce la interacțiuni electrostatice mai puternice cu grupările funcționale încărcate negativ de pe suprafața nanoplatformei, facilitând legarea ionilor de Mg^{2+} la nanoplatformă. În plus față de densitatea de sarcină, ionii Mg^{2+} au capacitatea de a forma complexe de coordonare stabile cu grupările fosfat, favorizând astfel legarea ADN-ului la suprafețe. Cu toate că și ionii Mg^{2+} pot forma astfel de complexe, densitatea lor de sarcină mai scăzută poate să nu permită o legare atât de eficientă a mADN-ului la nanoplatformă.

Membrana NC/NH₂-PEG-rGO a demonstrat o eficiență semnificativ mai mare în extracția mADN-ului în comparație cu membrana NC-GO dintr-un studiu anterior. Acest lucru se datorează prezenței grupărilor funcționale amino (NH₂) și polietilen glicol (PEG) care îmbunătățesc capacitatea de interacțiune și imobilizare a ADN-ului. Interacțiunile cu ioni Mg^{2+} sunt favorizate, ceea ce contribuie la o adsorbție mai eficientă a ADN-ului. În plus, nanoplatforma NC/NH₂-PEG-rGO are o suprafață mai mare, cu mai multe zone de legare accesibile pentru ADN, ceea ce sporește eficiența de adsorbție. Cu toate acestea, este necesară optimizarea tehnicii pentru a îmbunătăți eficiența și fiabilitatea, deschizând astfel noi perspective în extracția diverselor tipuri de biomolecule.

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare

Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

Tabel 2.3. Valorile cantității de mADN (pg) și deviația standard (s.d.) după 60 de minute de incubare pe nanoplatformele hibride NC și NC/NH₂-PEG-rGO în medii complexe cu diferite săruri (MnCl₂, MnCl₂/MgCl₂ și MgCl₂).

Săruri în mediile complexe	Desorbția de mADN din membrana NC măsurată în pg, cu deviația standard (s.d.).		Desorbția de ADN monocatenar (mADN) din membrana NC/NH ₂ -PEG-rGO măsurată în pg, cu deviația standard (s.d.).	
	pg	s.d.	pg	s.d.
Timp	60 minute			
U/M	pg	s.d.	pg	s.d.
MnCl ₂	286.41	±34.75	389.32	±54.98
MnCl ₂ /MgCl ₂	289.67	±34.4	482.35	±65.23
MgCl ₂	300.25	±37.1	611.12	±82.03

Analiza morfologiei nanoplatformelor de nitroceluloză și a nanoplatformelor de nitroceluloză cu grafenă redusă PEG aminată înainte și după experimente de adsorbție.

Înainte și după procedura de adsorbție, au fost efectuate evaluări morfologice atât pe nanoplatformele NC, cât și pe cele NC/NH₂-PEG-rGO. Înainte de experiment, micrografia SEM din Figura 2.11 A arată membrana NC, care prezintă o structură similară cu buretele, cu o porozitate mare și pori deschiși interconectați, caracterizați prin neregularități de suprafață. Omogenitatea observată este în concordanță cu natura poroasă inerentă a nitrocelulozei, oferind o reprezentare de bază a nanoplatformei netede. Figura 2.11 B surprinde schimbările morfologice

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare

Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

în membrana NC după incubarea experimentală în mediile utilizate. Schimbările observate în morfologie sunt de două tipuri; pe de o parte, aplatizarea suprafeței nanoplatformei NC indică o stabilitate moderată în mediile apoase, ducând la o morfologie de suprafață mai uniformă, sugerând o imobilizare eficientă a FAM-mADN, iar pe de altă parte, se poate observa ușor o schimbare în forma și dimensiunile porilor, fiind observate diametre mai puțin uniforme și mai mari ale porilor. În Figura 2.11 C, morfologia nanoplatformei NC poate fi observată sub un strat foarte subțire de NH₂-PEG-rGO, prezentând caracteristici în unele zone care indică flexibilitatea naturală a straturilor unice de grafenă, așa cum indică săgețile galbene, dar și aglomerarea ocazională a NH₂-PEG-rGO (inset, Figura 2.11 C).

În urma experimentului (Figura 2.11 D), se observă o aplatizare a morfologiei nanoplatformei, care a avut loc datorită legării FAM-mADN de nanoplatformă, făcând-o să pară mai densă și mai puțin transparentă în comparație cu membrana NC/NH₂-PEG-RGO și, de asemenea, cu membrana pură NC înainte de experiment. În plus, după experiment, suprafața nanoplatformelor NC și NC/NH₂-PEG-rGO par distincte, cu pori parțial acoperiți de mediu, observați în NC pur, și cu pori complet acoperiți de mediu, așa cum se observă în unele zone pe nanoplatforma hibridă NC/NH₂-PEG-rGO, indicând probabil o afinitate mai mare a nanoplatformei modificate pentru a imobiliza mADN în comparație cu membrana NC simplă.

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare

Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

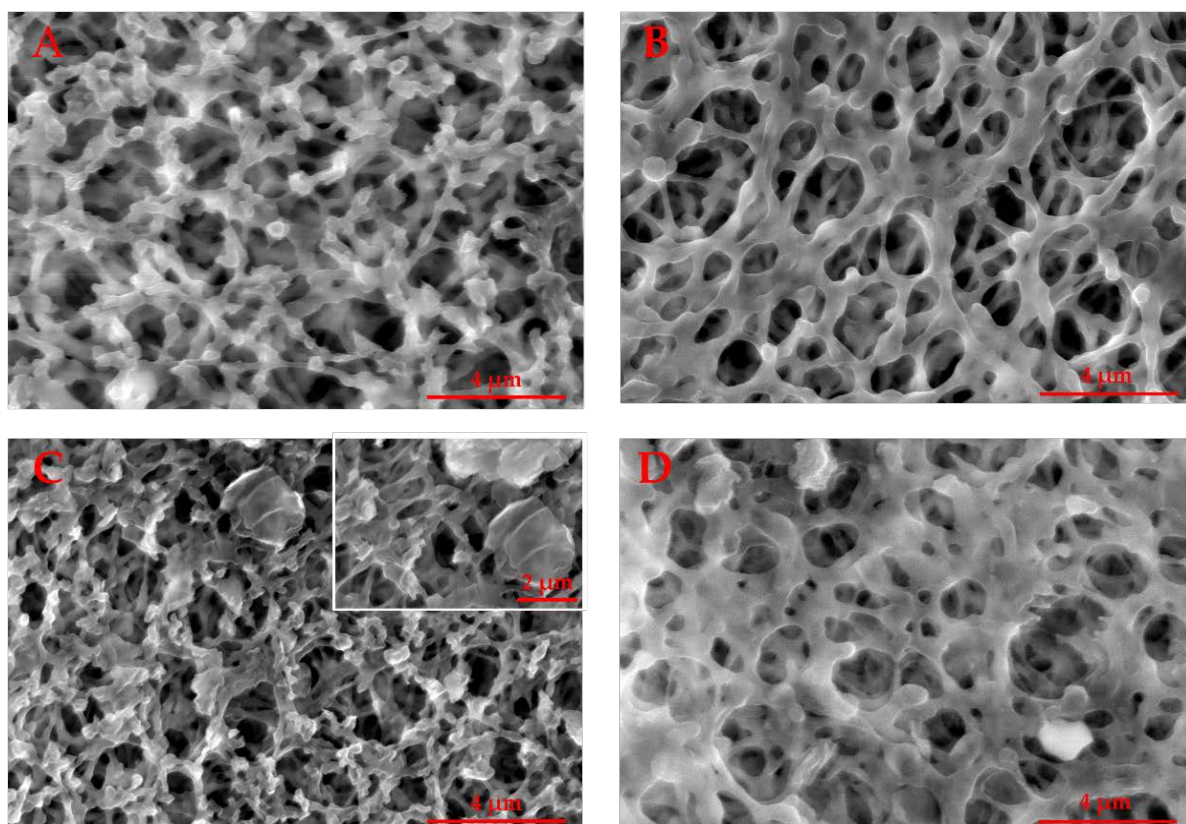


Figura 2.11. Micrografiile SEM care evidențiază membrana de NC înainte (A) și după (B) experiment, și membrana NC-NH₂-PEG-rGO înainte (C) și după (D) experiment, toate la o scală de 4 μm, insetul din figura C este la scală de 2 μm.

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare

Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

Analiza nanoplatformelor de nitroceluloză și a nanoplatformelor de nitroceluloză cu grafenă redusă PEG aminată prin tehnica FTIR.

Prin vibrațiile moleculare asociate cu fiecare bandă, tehnica FTIR oferă o înțelegere a structurii compozitelor investigate în acest studiu. Spectrele FTIR pentru NH₂-PEG-rGO, NC și nanoplatforme hibride NC/NH₂-PEG-rGO sunt ilustrate în Figura 2.12.

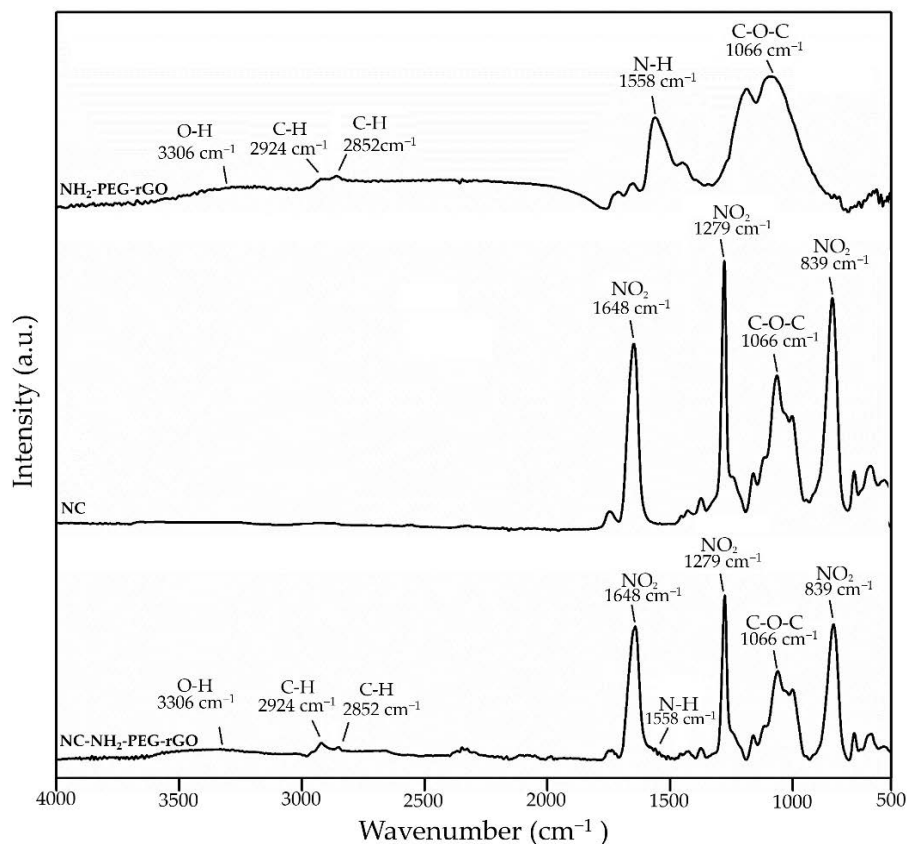


Figura 2.12. Spectrele FTIR ale NH₂-PEG-rGO, NC și a nanoplatformei hibride NC/NH₂-PEG-rGO.

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare

Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

De obicei, spectrul infraroșu al NH₂-PEG-rGO este caracterizat de valori de absorbție care se găsesc în mod obișnuit în secțiunile 1050-1085 cm⁻¹, 1650-1540 cm⁻¹ și 2800-3100 cm⁻¹. Aceste benzi spectrale sunt atribuite diferitelor moduri de vibrație, corespunzătoare grupărilor C-O-C (grupări epoxidice), N-H (amină) și C-H (grupări etilenice). În plus, banda spectrală de la aproximativ 3300 cm⁻¹ indică vibrațiile de întindere ale O-H (hidroxil), în stările lor libere și nelegate. În situația noastră particulară, benzile de absorbție menționate sunt vizibile la 1066, 1558, 2852 și 2924 cm⁻¹, precum și în spectrul cuprins între 3100 și 3400 cm⁻¹. Spectrul FTIR al nanoplatformei NC prezintă trei valori principale de absorbție situate la 1648, 1279 și 839 cm⁻¹, corespunzătoare întinderii simetrice și asimetrice a grupării NO₂.

Analiza FTIR a nanoplatformei hibride NC/NH₂-PEG-rGO prezintă benzile de absorbție caracteristice asociate atât cu NH₂-PEG-rGO, cât și cu NC, confirmând fabricarea cu succes a nanoplatformei hibride NC/NH₂-PEG-rGO. Prezența NH₂-PEG-rGO este evidențiată prin benzile de absorbție slab vizibile situate la aproximativ 3300 cm⁻¹, care sunt legate de grupările O-H din structura rGO, precum și prin vibrațiile de îndoire și întindere ale C-H în intervalul 2800-3100 cm⁻¹, corespunzătoare grupărilor etilenice din structura PEG. În plus, intensitatea benzii de absorbție corespunzătoare grupărilor amino în intervalul 1540-1600 cm⁻¹ (N-H) pare redusă, probabil datorită prezenței grupărilor funcționale NO₂ în proximitatea lor.

Materialele utilizate în fabricarea nanoplatformei hibride NC/NH₂-PEG-rGO au fost alese datorită avantajelor pe care le introduc în sistem. Componenta NC oferă stabilitate structurală nanoplatformei hibride, în timp ce NH₂-PEG-rGO, cu suprafața specifică mare și numeroasele grupări funcționale, este capabil să stocheze o gamă diversă de biomolecule. Această complementaritate crește rezistența nanoplatformei la forțe externe și favorizează simultan

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare

Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

adsorbția moleculelor pe suprafața sa. Aceste două beneficii subliniază importanța interacțiunii complementare între componente în îmbunătățirea atât a rezistenței mecanice, cât și a capacităților de adsorbție ale nanoplatei, fiind un aspect important al funcționalității sale.

Analiza nanoplatei de nitroceluloză și a nanoplatei de nitroceluloză cu grafenă redusă PEG aminată prin teste ale unghiului de contact cu apa.

Analiza unghiului de contact cu apa al nanoplatei NC și NC/NH₂-PEG-rGO este ilustrat în Figura 2.13. Măsurătorile sugerează că suprafața nanoplatei NC prezintă caracteristici hidrofile, în timp ce NC/NH₂-PEG-rGO prezintă caracteristici hidrofobe. Unghiul de contact cu apa în cazul nanoplatei NC (Figura 2.13 A) este de 16.5°, semnificând o răspândire substanțială a picăturilor de apă pe suprafață. Această observație sugerează că membrana prezintă caracteristici favorabile de umectare, manifestând o înclinație de a absorbi apa. Pentru membrana hibridă NC/NH₂-PEG-rGO (Figura 2.13 B), unghiul de contact cu apa este peste 90°, sugerând că suprafața nanoplatei prezintă caracteristici hidrofobe. Picătura de apă nu se dispersează pe suprafață, având tendința de a se forma în bob, semnificând că membrana manifestă o atracție redusă față de apă. Integrarea NH₂-PEG-rGO pe suprafața nanoplatei NC determină o modificare a caracteristicilor sale de suprafață, reducându-i natura hidrofilă. Caracteristicile prezentate de suprafața nanoplatei hibride NC/NH₂-PEG-rGO influențează semnificativ modul în care biomoleculele interacționează și răspund la nanoplatei. Componenta rGO, cunoscută pentru natura sa hidrofobă, adaugă o dimensiune contrastantă proprietăților de suprafață. Regiunile hidrofobe de pe suprafața rGO creează zone

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare

Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

pentru interacțiuni hidrofobe cu regiuni nepolare sau hidrofobe ale biomoleculilor, cum ar fi straturile lipidice sau inelele aromatice, contribuind la afinitatea nanoplatformei pentru anumite biomolecule. Aceste interacțiuni se extind la molecule precum mADN, unde regiunile sale hidrofobe, cum ar fi bazele nucleotidice, pot interacționa favorabil cu rGO, sporind afinitatea nanoplatformei pentru mADN. Componenta amino-funcționalizată a polietilen-glicolului (NH₂-PEG) introduce funcționalitate chimică specifică suprafeței. Grupările amino (-NH₂) pot facilita legături covalente sau electrostatice cu biomolecule care posedă grupări chimice sau sarcini complementare. Această funcționalizare îmbunătățește semnificativ versatilitatea nanoplatformei în immobilizarea biomoleculilor, cum ar fi mADN, furnizând o gamă diversă de potențiale legături chimice pentru un control precis.

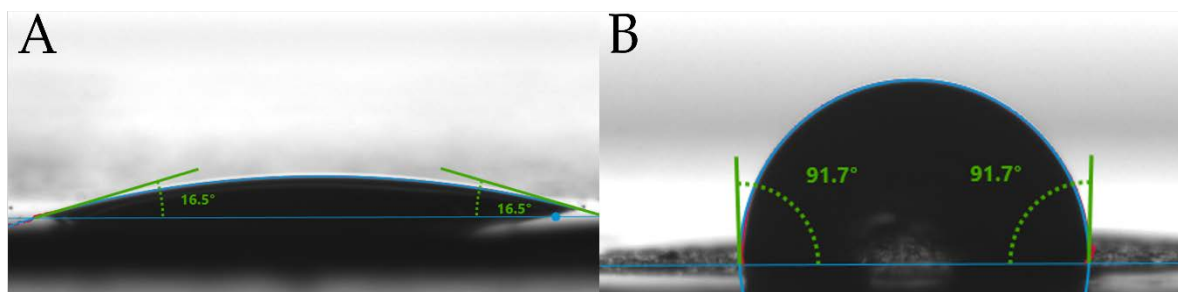


Figura 2.13. Unghiurile de contact cu apa ale (A) nanoplatformei NC și (B) nanoplatformei hibride NC/NH₂-PEG-rGO.

Concluzii

În concluzie, prin intermediul acestor experimente de laborator, pe de-o parte s-au sintetizat și analizat formulări compozite pe bază de gelatină, gelan și nanofibre de celuloză, în

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare

Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

combinație cu diferite materiale grafenice (GA, GC și GA/GC), destinate testelor mecanice de compresiune, tracțiune și forfecare. În urma acestor teste mecanice, cele mai bune rezultate au fost obținute de formularea compozită cu GA/GC, cu valori ale rezistenței la compresiune de 0.38 MPa și ale rezistenței la tracțiune de 0.21 Mpa, iar modulele de stocare și pierdere pentru testele de forfecare sunt aferente naturii de hidrogel. Astfel, în urma testelor mecanice realizate, formularea compozită C-G-GG_GA/GC prezintă valori ale proprietăților de compresiune, tracțiune și forfecare comparabile cu cele ale osului trabecular. Rezistența la compresiune a osului trabecular se situează în intervalul de 0.1-16 MPa. Aceste rezultate sugerează că nanocompozitul C-G-GG_GA/GC ar putea fi o opțiune promițătoare pentru dezvoltarea de înlocuitori osoși.

Pe de altă parte, s-au realizat studii asupra nanoplatformelor de nitroceluloză cu grafenă redusă PEG aminată în ceea ce privește cinetica de adsorbție și desorbție a moleculelor ASO de ADN, pe baza rezultatelor obținute în prima parte a studiului. Caracteristicile structurale și morfologice obținute prin investigațiile FTIR și SEM au demonstrat fabricarea cu succes a nanoplatformei hibride. Microscopia SEM a dezvăluit o structură asemănătoare unui burete sub un strat foarte subțire de grafenă cu aglomerări rare, evidențiind dispersia și acoperirea uniformă a NH₂-PEG-rGO pe membrana NC. Caracteristicile de umectare au arătat că membrana hibridă NC/NH₂-PEG-rGO a prezentat un caracter hidrofob, cu un unghi de contact semnificativ mai mare de 91.7°, în comparație cu membrana de control NC, care a prezentat un unghi de contact de 16.5°. Caracterul hidrofob mai mare al nanoplatformei este considerat să aibă un efect benefic asupra adsorbției de acizi nucleici.

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare

Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

Rezultatele intensității de emisie a fluorescenței demonstrează că membrana hibridă NC/NH₂-PEG-rGO a adsorbit și desorbit constant oligonucleotide în trei medii complexe cu compoziții ionice diferite (MnCl₂, MnCl₂/MgCl₂ și MgCl₂). În mod remarcabil, mediul care conținea MgCl₂ a prezentat cel mai favorabil rezultat.

În cazul controlului, membrana NC a prezentat o capacitate redusă de a adsorbi mADN, rezultând cea mai scăzută intensitate fluorescentă de aproximativ 250 r.f.u. în mediul cu MnCl₂, ceea ce corespunde unei cantități de 286 pg. Datele obținute sugerează că modificarea nanoplatfomei NC cu NH₂-PEG-rGO îmbunătățește substanțial interacțiunea sa cu acizii nucleici, rezultând o afinitate de legare semnificativ mai mare.

După incubarea nanoplatfomei hibride NC/NH₂-PEG-rGO în medii complexe cu MgCl₂, cea mai mare intensitate fluorescentă a afișat un semnal peste 520 r.f.u., corespunzător unei cantități de 611 pg mADN. Cu toate acestea, atunci când nanoplatfoma a fost incubată în medii complexe cu MnCl₂, semnalul fluorescent a scăzut la 330 r.f.u., corespunzând cu 290 pg mADN. Mai mult, în orice tip de mediu utilizat, NC/NH₂-PEG-rGO poate imobiliza un număr mai mare de oligonucleotide decât membrana NC.

Prin urmare, rezultatele cercetării noastre indică în mod categoric faptul că, atunci când membrana NC este modificată cu NH₂-PEG-rGO, aceasta permite o capacitate de imobilizare a mADN mai ridicată pe suprafața nanoplatfomei. Această îmbunătățire semnificativă în imobilizarea mADN evidențiază potențialul NH₂-PEG-rGO ca alegere superioară pentru modificarea nanoplatfomei, cu implicații profunde pentru aplicațiile care necesită o imobilizare și extracție eficientă a oligo-ADN.

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare

Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

PARTEA a III-a

În domeniul cercetării biomedicale, medicina regenerativă a țesutului osos se concentrează pe dezvoltarea și aplicarea de strategii inovatoare pentru a încuraja regenerarea naturală a țesutului osos afectat sau deteriorat. Proiectul REOSTEOMi explorează tehnologii avansate, inclusiv bio-printarea 3D și sinteza de formulări printabile, împreună cu adaptarea terapiilor personalizate. Scopul principal al proiectului este producerea înlocuitorilor osoși cu o capacitate de regenerare îmbunătățită, oferind o contribuție semnificativă în tratarea unui spectru larg de afecțiuni, de la fracturi comune la complicații asociate cu boli precum MM.

În acest studiu, au fost realizate experimente pentru a dezvolta înlocuitori osoși personalizați, utilizând tehnologia avansată de bio-printare 3D. Prin urmare, s-au creat cerneluri compozite integrate cu nanomateriale pe bază de oxid de grafenă (GO). Designul acestor cerneluri se bazează pe sinergiile dintre GelMA și GGMA. În plus, s-a realizat sinteza unui nou lot de GGMA cu un grad de metacrilare de 4%.

Materiale și Metode:

Sinteza gelanului metacrilat.

Gelanul (GG), a fost modificat chimic prin introducerea de grupări metacrilamidă, rezultând GGMA. Această modificare a fost realizată prin reacția directă a gelanului cu anhidrida metacrilică într-o soluție TFS. În cadrul acestui proces, o cantitate totală de 5 grame de gelan a fost utilizată, iar pentru fiecare gram de gelan s-au adăugat 100 ml de TFS și 4 ml de anhidridă

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare

Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

metacrilică. Acest procedeu a fost adoptat pentru a proteja reacția de amidare care are loc simultan cu reacția de metacrilare.

Pentru a menține condițiile ideale pentru desfășurarea reacției, pH-ul soluției a fost menținut între 8 și 8.5. Pentru aceasta, s-a folosit o soluție de hidroxid de sodiu (NaOH) de concentrație 1M pentru ajustare și stabilizare, deoarece pH-ul influențează direct reacția de metacrilare, asigurându-se astfel o transformare optimă a gelanului în GGMA.

Un aspect important al procesului a fost de a proteja reacția de amidare, care poate avea loc simultan cu reacția de metacrilare. Prin menținerea pH-ului în intervalul specificat, s-a limitat formarea de grupări amidă, asigurându-se că toate modificările chimice sunt orientate către introducerea grupărilor de metacrilamidă.

Pentru a obține un produs final pur și adecvat pentru aplicații biologice, soluția rezultată a fost dializată timp de trei zile. Acest proces a implicat înlocuirea apei soluției o dată pe zi și utilizarea unor nanoplatforme de dializă cu o dimensiune a porilor de 14000 daltoni. Această etapă este esențială pentru îndepărtarea excesului de inițiatori sau alte impurități care pot rămâne în soluție după reacția de metacrilare.

Procesul de liofilizare

Ulterior dializei, soluțiile au fost transferate în cutii Petri și congelate pentru a fi liofilizate (figura 3.1). Liofilizarea s-a desfășurat la o presiune de 0.28 bari timp de 48 de ore, după care GGMA a fost depozitat la temperatura camerei. După acest proces, mostrele prezintă o structură uscată, solidă și poroasă, așa cum se evidențiază în figura 3.2.

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare

Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

Caracteristicile distinctive ale probelor după liofilizare pot varia în funcție de compoziția inițială și parametrii specifici ai procesului. În general, se pot identifica aspecte cheie, cum ar fi textura poroasă.

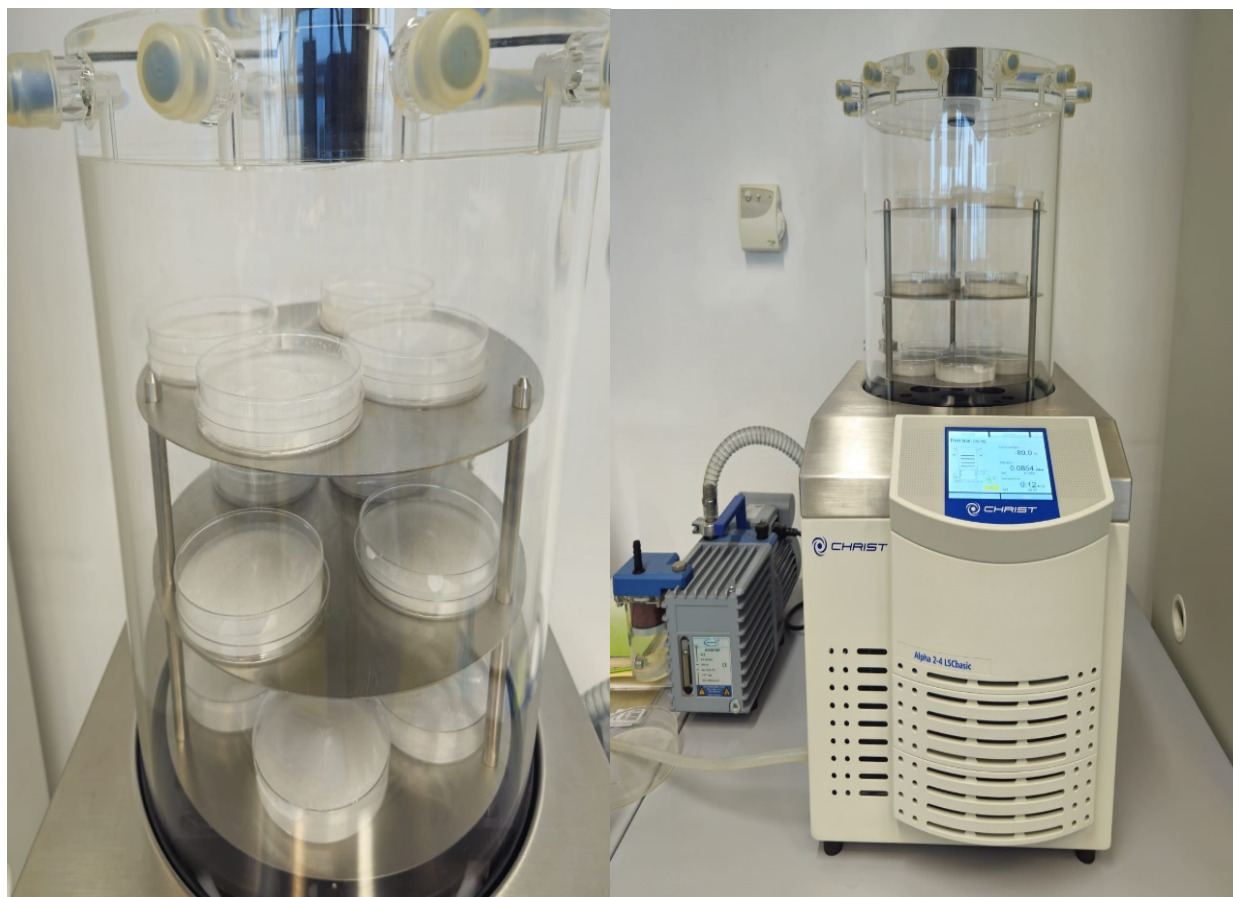


Figura 3.1. Procesul de liofilizare a GGMA.

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare

Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

Figura 3.2. GGMA după liofilizare.

Determinarea modificării gelanului cu anhidrida metacrilică prin analize de spectroscopie în infraroșu cu transformata Fourier (FTIR).

Metacrilarea gelanului a fost confirmată prin spectroscopie FTIR (Figura 3.3). Spectrele FTIR ale GG modificat și nemodificat prezintă benzi largi între 3000 și 3600 cm^{-1} , aferente grupării $-\text{OH}$, și vibrații care implică benzile de întindere ale C-O la 1030 cm^{-1} ,

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare

Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

caracteristice polizaharidelor. Maximele de la 1160, 1300-1400 cm^{-1} se datorează vibrațiilor de întindere a C-C și, respectiv, CH.

Semnalul caracteristic al maximului dublei legături, observat în spectrele derivaților metacrilati la 1610 cm^{-1} , reprezintă întinderea vibrațională C=C în fracțiunea metacrilat a GG, în timp ce banda de absorbție de la 1718 cm^{-1} este atribuită benzii vibraționale de întindere a carbonilului (C=O), confirmând modificarea chimică a GG și creșterea intensității benzii odată cu creșterea gradului de metacrilare.

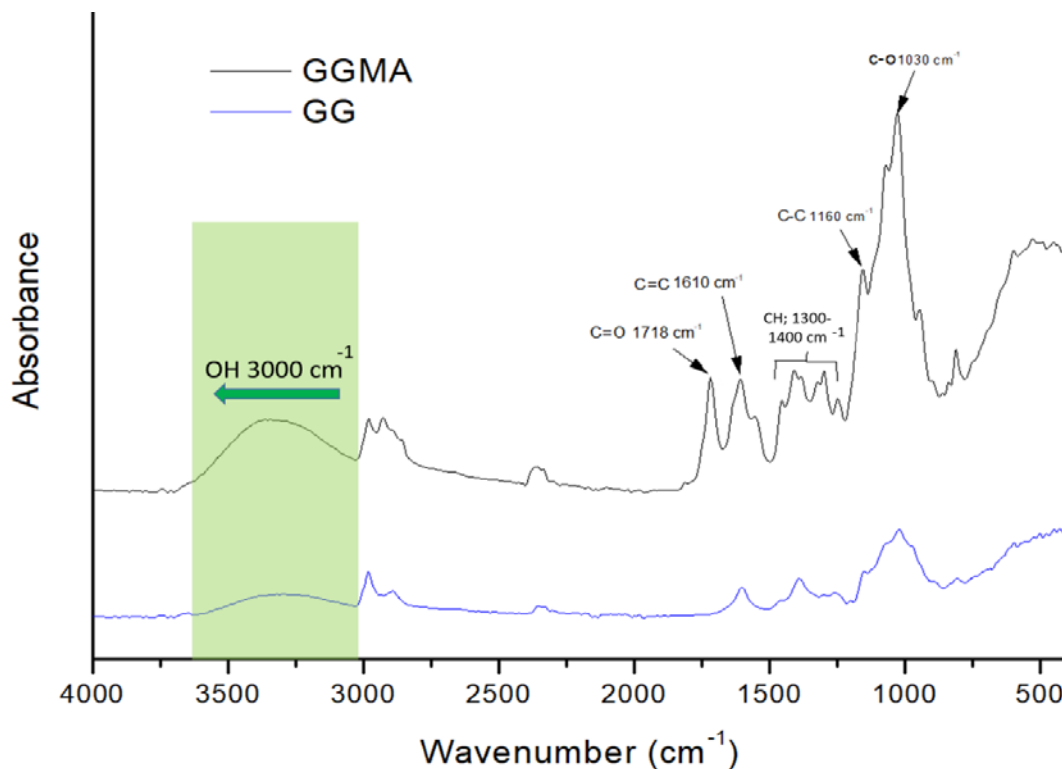


Figura 3.3. Spectrele FTIR ale gelului (GG-albastru) și ale gelului metacrilat (GGMA-negru).

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare

Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

Determinarea gradului de metacrilare al GGMA prin analiza RMN

În cazul GG, gradul de metacrilare a fost determinat utilizând ecuația 3.1.

$$\% \text{ GM} = \frac{\frac{IDB}{\eta_{HDB}} / \frac{ICH3rham}{\eta_{HCH3rham}}}{\eta_{OHmonomer}}, \quad (3.1)$$

unde *IDB* este integrarea semnalului pentru dubla legătură din grupările metacrilice; *ICH3rham* reprezintă integrarea semnalului de referință pentru ramnoză; $\eta_{HCH3rham}$, η_{HDB} este numărul de protoni din legătura dublă și din gruparea metil a compusului metil-pentoză și, respectiv, ramnoză iar $\eta_{OHmonomer}$ reprezintă numărul de grupări hidroxil din gelan. Astfel, după aplicarea formulei, și cu valorile din spectrele RMN din figura 3.4, gradul de metacrilare al GG este de aproximativ 4%.

Conform literaturii, gradul de metacrilare de 4% aferent gelanului este unul ideal pentru aplicarea în sinteza de hidrogeluri [3, 4].

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare

Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

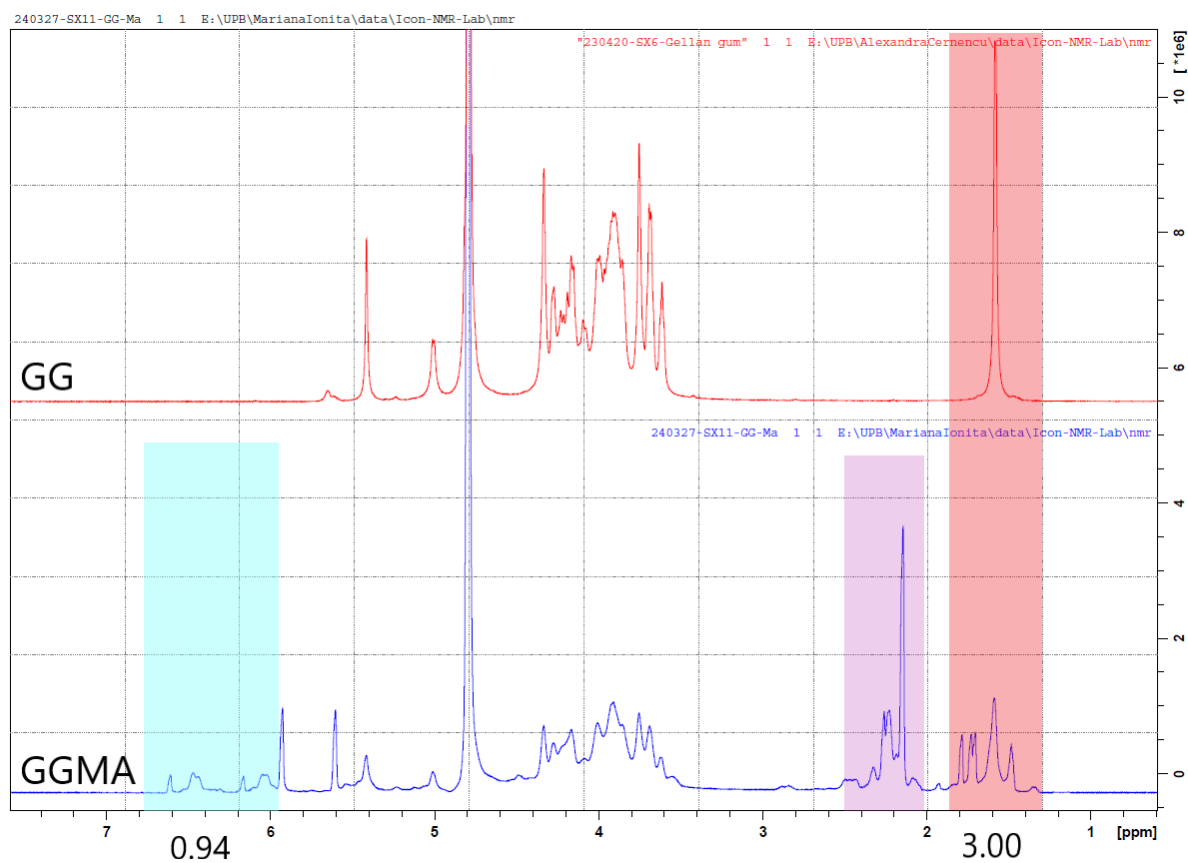


Figura 3.4. Spectrele RMN pentru gelan și gelan metacrilat.

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare

Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

Elaborarea unui protocol de sinteză pentru formulările printabile din GelMA, GGMM și GO.

Prima etapă a realizării formulării printabile a implicat dizolvarea a 0.4 g GGMA în 5 mL apă distilată la o temperatură de 75-80°C, urmată de scăderea temperaturii cu ajutorul unei băi de gheață până la 40°C și adăugarea a 1.6 g GelMA. După solubilizarea completă a GelMA, s-a adăugat LAP într-o concentrație de 0.5% în funcție de cantitatea de polimer.

Inițial, s-a efectuat printarea cu această formulă, iar ulterior, s-a adăugat 0.5% GO. Pentru a evalua impactul GO asupra posibilității de printare a formulărilor, aceasta a fost ultrasonată în soluția de GGMA/GelMA pentru o durată de 1 oră. Amplitudinea vibrațiilor sondei a fost setată la 30% pe întreaga durată a procedurii, cu pulsații timp de 15 secunde și 5 secunde pauză.

Reticularea formulărilor printabile.

Prima etapă a reticulării a fost inițiată de LAP care induce reticularea formulărilor la o lungime de undă de 405 nm. Apoi, a urmat o a doua etapă de reticulare în soluție de clorură de calciu 2%, în care suporturile printate au fost amplasate timp de 10 minute.

Parametrii de lucru

În cadrul acestui studiu, s-a evaluat capacitatea de printare a materialelor prin aplicarea procesului de extrudare directă, utilizând bioimprimanta BIO X6, fabricată de CELLINK. Procedura de printare s-a desfășurat la o temperatură constantă de 37 °C pentru toate formulările

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare

Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

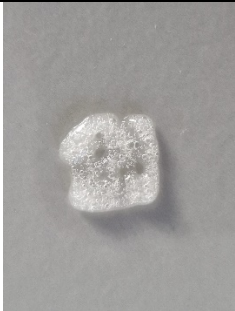
Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

testate. Prima formulare printabilă investigată a fost fără oxidului de grafenă, iar detaliile referitoare la parametrii de lucru sunt prezentate în Tabelul 3.1.

Materialele printate au fost dispuse direct în cutii Petri din plastic, iar evaluarea procesului a inclus optimizarea presiunii și vitezei de printare, alături de utilizarea diverselor tipuri de ace, caracterizate prin diametre variabile: 21G (violet), 23G (portocaliu) și 25G (roșu), corespunzând diametrelor interioare de 0.81 mm, 0.64 mm și, respectiv, 0.51 mm.

Pentru a asigura reticularea adecvată a structurilor printate, fiecare strat a fost expus la lumina UV emisă de aparatul de printare, pentru o perioadă de 45 de secunde, la o intensitate de 30 mW.

Tabel 3.1. Parametri utilizați în procesul de printare al formulării din GGMA/GelMA

GelMA/GGMA			
Tipul acului folosit	Presiune (kPA)	Viteza capului de printare(mm/s)	Imagini ale structurii printate
21G (0.81 mm diametru interior)	60	10	

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare

Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

	50	10	
	50	8	
	40	8	

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare


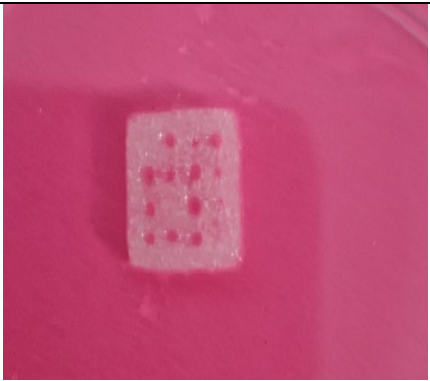
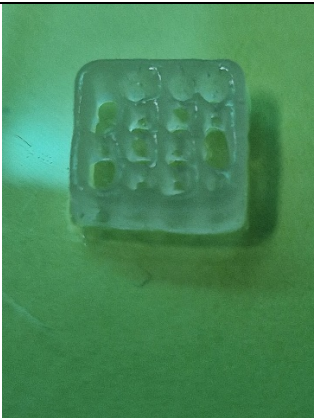
Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

	30	8	
	20	8	
23G (0.64 mm diametru interior)	150	10	

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare



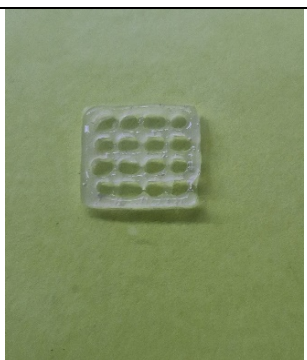

Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

	150	9	
	140	9	
	135	8	

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare

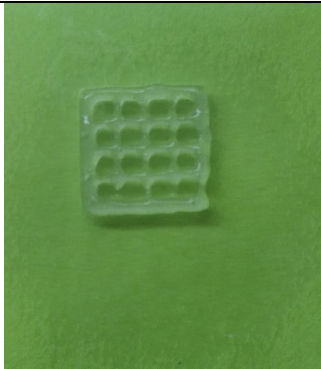
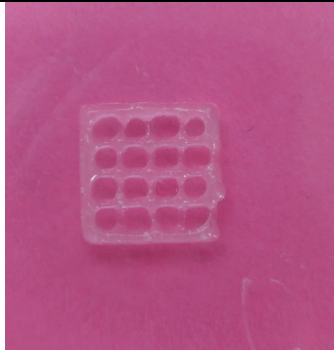

Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

	130	8	
	125	8	
	125	7	

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare

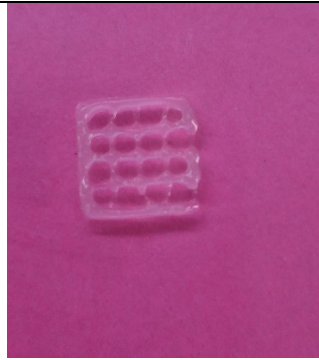
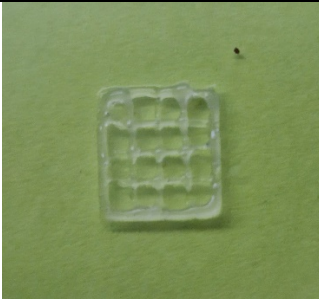
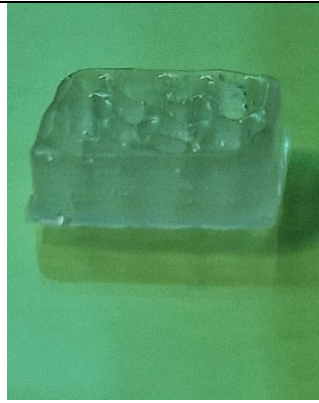
Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

	120	8	
	120	9	
	125	8	

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare




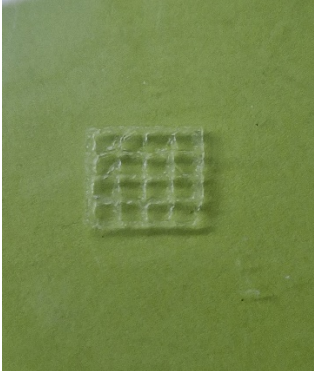
Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

25 G (0.51 mm diametru interior) 	200	10	
	350	10	
	500	10	

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare

Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

În urma analizei tuturor parametrilor utilizați pentru printarea formulării GelMA/GGMA, conform datelor prezentate în tabelul 3.1, s-a constatat că vârful de culoare portocalie de dimensiune 23G, la o viteză a acului de printare de 8 mm/s și o presiune de 125 kPA, a produs rezultatele cele mai favorabile. Acești parametri au demonstrat cea mai bună capacitate de reproducere a detaliilor, comparabilă cu modelul CAD ilustrat în Figura 3.5 (caracterizată prin linii precise și subțiri, precum și prin porii interni cu structură pătrată).

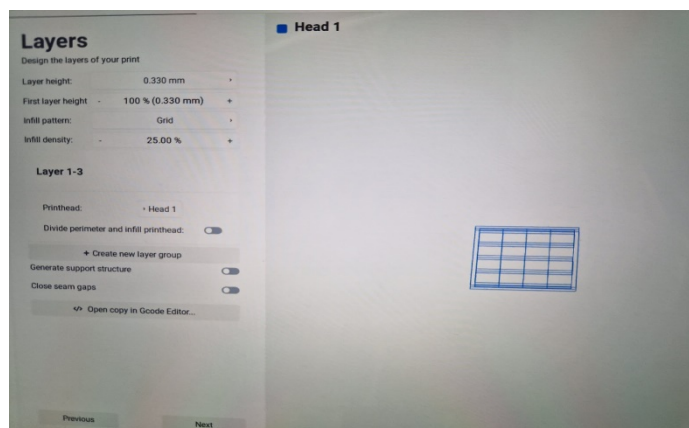


Figura 3.5. Modelul CAD utilizat pentru printare

Adăugarea a 0.5 % GO în soluția de GelMA/GGMA a condus la modificarea vâscozității formulării, rezultând structuri mai încărcate cu material și cu pori mai ovalizați. Totuși, după optimizarea parametrilor s-au obținut modele similare cu modelul CAD, astfel conform tabelului 3.2, parametrii ideali pentru a obține fidelitatea de printare au fost folosind un ac portocaliu cu dimensiunea de 23 G, o viteză a acului de printare de 10 mm/s și o presiune de 190 kPA.

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare

Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8



Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

Tabel 3.2. Parametrii utilizați în procesul de printare al formulărilor compuse din GelMA/GGMA și GO.

GelMA/GGMA și GO			
Tipul acului folosit	Presiune (kPA)	Viteza capului de printare (mm/s)	Imagini ale structurii printate
21G (0.81 mm diametru interior)	20	10	
	60	10	

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare


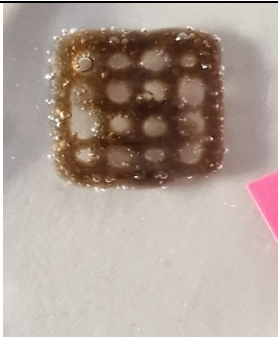

Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

	70	10	
	75	9	

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare



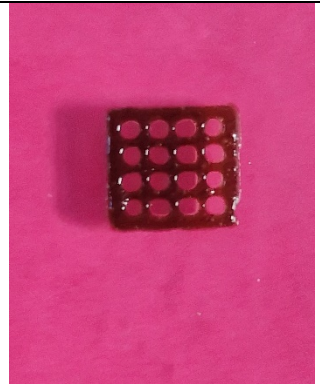
Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

23G (0.64 mm diametru interior) 	210	14	
	210	12	

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare

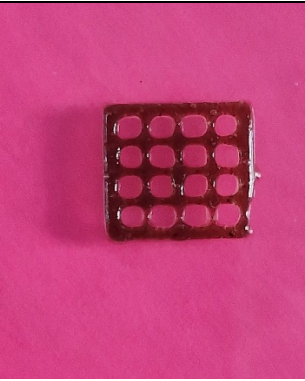
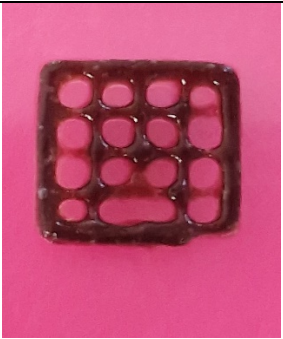
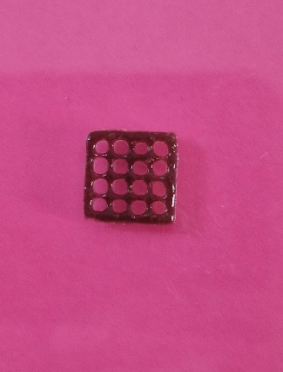
Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

	210	11	
	220	11	
	200	11	

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare

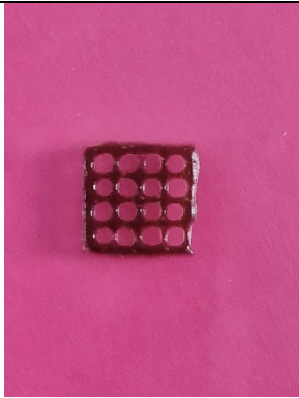
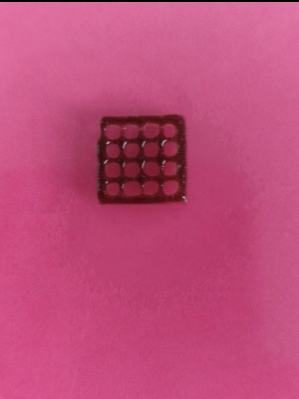
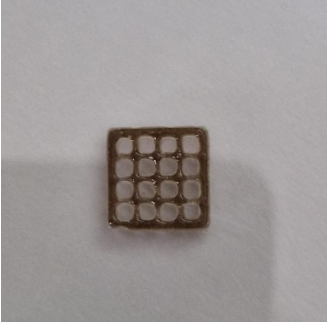
Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

	200	12	
	200	10	
	190	10	

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare

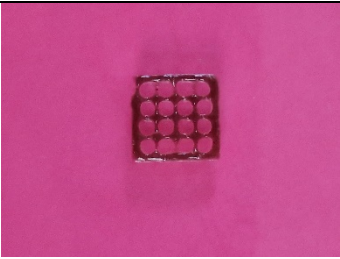


Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

	180	10	
	200	10	 

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare

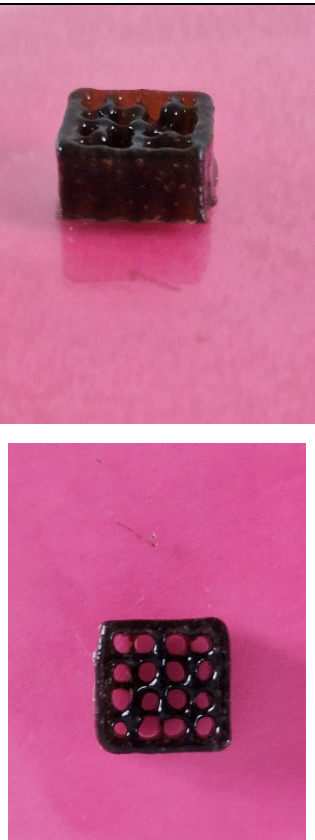
Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

	190	10	

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare


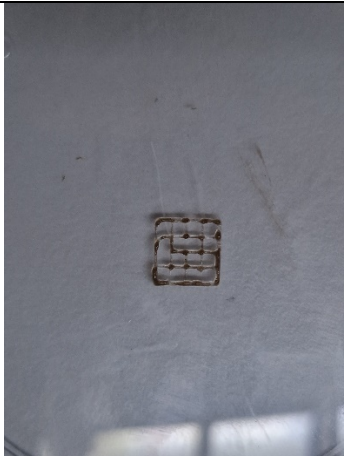
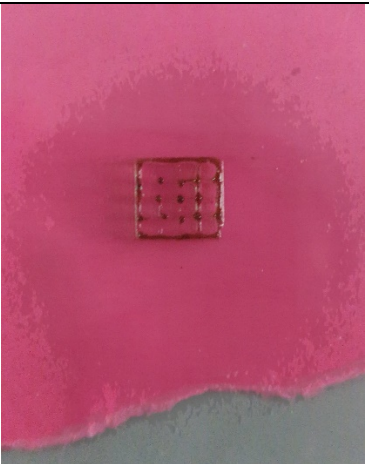
Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

<p>25 G (0.51 mm diametru interior)</p> 	<p>500</p>	<p>10</p>	
	<p>550</p>	<p>10</p>	

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare


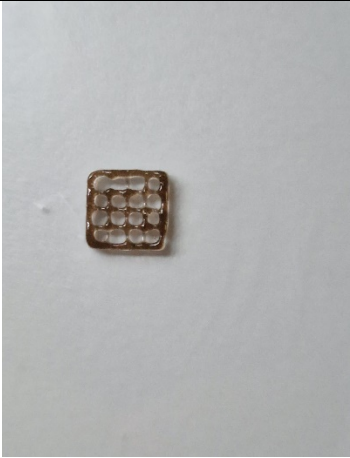
Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

	600	10	
	650	10	

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare

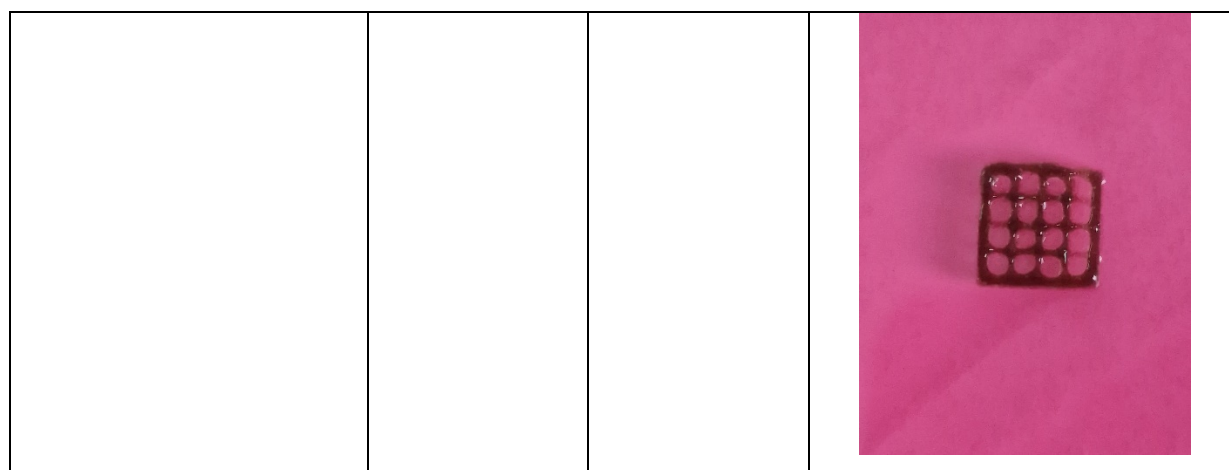
Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma



Concluzii

În final, prin intermediul acestor experimente de laborator, s-au realizat formulări printabile pe bază de GelMA/GGMA și GO. Optimizarea parametrilor de printare pentru aceste formulări a condus la obținerea unor modele 3D similare cu modelul CAD de referință. Astfel, în cazul controlului GelMA/GGMA, cea mai bună fidelitate de printare s-a obținut utilizând un ac cu dimensiunea de 23G, o presiune de 125 kPa și o viteză cuprinsă între 8 mm/s. Pentru GelMA/GGMA cu 0.5% GO, cele mai bune rezultate au fost obținute prin utilizarea unui ac de dimensiunea 23G, o presiune de 190 kPa și o viteză de printare de 10 mm/s. Prin urmare, optimizarea parametrilor de printare a facilitat obținerea unor modele 3D de înaltă calitate, reflectând fidelitatea și precizia dorită în procesul de fabricare.

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare

Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

În plus s-a realizat sinteza de gelan metacrilat, metodele de analiză precum FTIR și RMN confirmând metacrilarea eficientă cu un grad de metacrilare de 4%.

Bibliografie:

- [3] Laura E. Agibayeva, Daulet B. Kaldybekov, Natalia N. Porfiryeva, Venera R. Garipova, Rauash A. Mangazbayeva, Rouslan I. Moustafine, Irina I. Semina, Grigoriy A. Mun, Sarkyt E. Kudaibergenov, Vitaliy V. Khutoryanskiy, Gellan gum and its methacrylated derivatives as in situ gelling mucoadhesive formulations of pilocarpine: In vitro and in vivo studies, International Journal of Pharmaceutics, Volume 577, 2020, 119093, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119093>.
- [4] Xu, Zihao & Li, Zhuqing & Jiang, Shan & Bratlie, Kaitlin. (2018). Chemically Modified Gellan Gum Hydrogels with Tunable Properties for Use as Tissue Engineering Scaffolds. ACS Omega. 3. 6998-7007. 10.1021/acsomega.8b00683.

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare

Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

PARTEA a IV-a

Investigarea Gapmerii ASO funcționalizați cu LNA, 5-metilcitozină și fosforotioat

MM este o afecțiune hematologică malignă care afectează măduva osoasă, caracterizată prin expansiunea clonală a plasmocitelor maligne care invadează osul adiacent și, ocazional, se infiltrează în mai multe organe, provocând astfel leziuni osoase, anemie, insuficiență renală și imunodeficiență, dar afectează și rezultatul transplanturilor de celule stem, provocând reinfecția grefei, ceea ce duce la rezultate terapeutice slabe.

În ciuda progreselor înregistrate în strategiile de tratament, MM rămâne o boală incurabilă, ceea ce necesită explorarea unor noi abordări terapeutice. Una dintre aceste abordări este utilizarea ASO.

ASO sunt oligodeoxinucleotide antisens scurte, sintetice, monocatenare, care se pot lega în mod specific de moleculele de ARN țintă prin împerechere de baze Watson-Crick. Aceștia oferă o strategie terapeutică promițătoare datorită capacității lor de a modula expresia genelor, ceea ce poate fi benefic în boli precum MM, în care anumite gene sunt supraexprimate.

Utilitatea terapiilor ASO în MM constă în potențialul lor de a ținti și de a suprima expresia genelor care determină patogeneza MM, ce implică dereglarea genelor de control al ciclului celular, a genelor legate de apoptoză și a genelor implicate în rezistența la medicamente. ASO pot fi concepute pentru a ținti aceste gene, inhibând astfel expresia lor și reducând potențial proliferarea celulelor mielomatoase. Design-urile ASO explorate în acest raport sunt gapmeri funcționalizați cu locked nucleic acid (LNA), 5-metilcitozina și fosforotioat.

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare

Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

Gapmerii ASO sunt structuri scurte de oligonucleotide constituite dintr-o regiune centrala (gap) ADN și segmente asemănătoare ARN-ului pe ambele flancuri ale secvenței. Acestea sunt concepute pentru a hibridiza cu ARN țintă integral sau parțial, pentru a secvenția gene prin inducerea clivajului mediat de RNazăH. Structura gapmer este concepută pentru a crește rezistența la degradarea nucleazei și pentru a spori stabilitatea in vivo.

Modificarea fosforotioat (PS) îmbunătățește stabilitatea la degradare sub acțiunea nucleazelor și proprietățile de legare la ținte ale gapmerilor ASO. Este una dintre modificările care susțin activitatea RNaseH. PS ajută la stabilizarea regiunii "gap" a ADN-ului împotriva degradării nucleolitice. De asemenea, este utilizat pentru a stabiliza substanțele terapeutice și ARN împotriva degradării exonucleazei, ceea ce duce la răspunsuri clinice durabile.

5-metilcitozină (5mC) este o modificare care poate fi utilizată în mod eficient pentru a îmbunătăți împerecherea bazelor și a crește hibridizarea cu ARN-ul țintă. Natura hidrofobă a grupărilor din poziția C-5 contribuie la excluderea moleculelor de apă din duplex și, prin urmare, la creșterea temperaturii de topire cu aproximativ 1.3°C pentru fiecare substituție. Oligonucleotidul ARN modificat cu 5mC are, prin urmare, un efect dezirabil asupra afinității oligonucleotidelor antisens.

LNA sunt un tip de nucleotide ARN modificate în care moietatea riboză este modificată cu o punte suplimentară care leagă oxigenul 2' și carbonul 4'. Această punte "blochează" riboza în conformația 3'-endo, care se găsește adesea în duplexurile de tip A. Această structură asigură o stabilitate sporită împotriva degradării enzimatică. LNA oferă o specificitate și o afinitate îmbunătățite în împerecherea bazelor ca element constitutiv al unei oligonucleotide. Aceștia pot fi intercalați cu porțiuni de ADN sau ARN într-o oligonucleotidă, conferind o stabilitate

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare

Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

structurală sporită, ceea ce duce la o temperatură de topire (T_m) de hibridizare mai mare. LNA-urile oferă, de asemenea, rezistență la nucleaze, crescând timpul de înjumătățire al acestora.

Materiale și metode:

Țintele ncRNA identificate în literatura de specialitate în vederea obținerii de modele atomistice pentru acest experiment sunt următoarele: hsa-mir-15a 5p; hsa-mir-15a 3p; hsa-miR-17 5p; hsa-miR-17 3p; hsa-miR-18a-5p; hsa-miR-18a-3p; hsa-miR-19a 5p; hsa-miR-19a 3p; hsa-miR-19b-1-5p; hsa-miR-19b-1-3p; hsa-miR-20a 5p; hsa-miR-20a 3p; hsa-mir-92a-1 5p; hsa-mir-92a-1 3p; hsa-miR-342-5p; hsa-miR-342-3p; pir-823.

Etape de obținere a țintelor miRNA și ASO-urilor corespunzătoare:

1. Datele și secvențele miARN au fost obținute folosind miRBASE și cuprind structura Stem-loop a miARN precursor, secvențele variantelor miARN matur 5p și 3p, în notație Viena;

2. Structurile secundare ale secvențelor de ncARN țintă au fost calculate și minimizate cu ajutorul serverului web RNAFold. Algoritmul Vienna package a fost utilizat în plierea ab initio pentru a obține energia liberă minimă (MFE) a sistemului precum și algoritmi de mezoscală, cum ar fi modelul Centroid;

3. Modelele atomistice ale structurii terțiare a ncARN țintă au fost obținute și minimizate cu ajutorul serverului web RNAComposer pe baza datelor structurii secundare calculate cu RNAFold Webserver;

4. Secvențele inverse de ADN și ARN pentru a fi implementate în construcția catenelor complementare ASO au fost calculate pentru toate ncARN folosind generatorul de secvențe inverse și complementare de ADN/ARN Bugaco;

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare

Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

5. Țintele miARN selectate pentru experimentul prezentat aparțin clusterului Hsa-mir-17-92 și sunt următoarele: hsa-miR-17 5p; hsa-miR-19a 3p; hsa-miR-19a 5p; hsa-miR-20a 5p;

6. Tiparele de funcționalizare chimică ASO au fost selectate și apoi proiectate pe baza principiilor descrise în literatura de specialitate. Predicția structurii secundare care indică autohibridizarea nmerilor de mADN a fost calculată cu ajutorul serverului web UnaFold. Alte profile de stabilitate termodinamică ale catenelor țintă, care indică o interacțiune favorabilă cu ASO, au fost calculate și analizate folosind modulul Srna din Sfold cu temperatura de pliere 37°C și condiții ionice 1M NaCl, fără ioni divalenți;

7. Proto nucleic acid builder (PNAB) a fost utilizat pentru a construi și a minimiza modelele atomistice de referință ale ASO-urilor ADN și ARN nemodificate complementare miARN-urilor țintă și, de asemenea, heteroduplexuri hibridizate ARN-ARN și ADN-ARN corespunzătoare, care servesc drept model de control pentru ASO-urile modificate. Modificările LNA pentru ASO-uri au fost, de asemenea, construite cu ajutorul PNAB;

8. ASO-urile modificate au fost construite manual cu ajutorul pyMol, folosind ca date de intrare de plecare modelul de bază monocatenar nemodificat de ADN PO și ARN, precum și LNA-urile construite anterior în PNAB. Catena mADN nemodificat de referință a fost funcționalizată cu LNA, PS și 5-metilcitozină în conformitate cu tiparele de funcționalizare chimică, stabilite în etapa 6;

9. ASO-urile anti miARN (antiMIR) modificate urmează a fi hibridizate cu miARN-urile lor țintă și echilibrate pentru a obține datele relevante privind energia liberă minimă, energia de hibridizare, forțele de legare, temperaturile de topire și stabilitatea în solvent, în vederea integrării acestora în nanocuști ADN origami și adsorbției la suprafața grafenelor modificate;

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare

Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

10. VMD și pyMol au fost utilizate pentru a construi modelul atomistic al grafenei simple, ce a fost utilizată pentru funcționalizarea ulterioară a GO.

Toate ASO-urile urmează același model, schelet complet fosforotioat și flancuri LNA pentru a asigura o rezistență ridicată la degradare și timp de înjumătățire crescut, având în vedere că vehiculul de livrare este format din ADN, PO, ARN sau materiale grafenice. Timpul de înjumătățire mărit asigură o activitate prelungită în momentul absorbției celulare în citoplasmă, compensând afinitățile de legare potențial reduse cu miARN-urile, interacțiunile nespecifice cu proteinele și nucleazele, ceea ce poate duce la doze administrate mai mici la intervale de timp mai lungi. Modificările 5MC au fost alese pentru toxicitatea lor scăzută, proprietățile slab imunogene și afinitatea de legare crescută față de ARN-țintă.

În prezentul raport au fost explorate configurații ASO de diferite dimensiuni în vederea alegerii unor candidați promițători pentru studiile de dinamică moleculară asupra legării acestora de materiale grafenice și integrarea în nanocuști ADN.

Gapmerii de 23mer au fost aleși datorită avantajului de a asigura degradarea completă a catenei țintă cu o probabilitate mai mare de a promova legarea RNAzăH și degradarea completă a miARN-urilor țintă, datorită formării unui heteroduplex pe toată lungimea țintei.

Gapmerii 16mer și 13mer sunt diferiți de designul tradițional, care se leagă de regiunea centrală a miARN-ului țintă, și au fost concepuți pentru a ataca regiunea SEED a miARN-ului țintă pentru a obține o degradare maximă a secvenței SEED responsabilă pentru recunoașterea ARNm țintă. Avantajele acestora includ o greutate moleculară mică, o bună împachetare sterică în vehiculul de livrare, ceea ce duce la sarcini utile mari și, eventual, la o rată de degradare mare a miARN țintă.

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare

Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

Rezultate

Abrevieri ASO: L= LNA; D= ADN; *= fosforotioat; 5MC= 5 metilcitozină, PO=fosfat
ANTI miR-20a 5p

Gapmer-ul 23mer a fost conceput cu flancuri LNA pentru a crește specificitatea și cu un schelet de fosforotioați integral modificat pentru a maximiza rezistența la exonucleaze.

Ambele variante 23mer urmează un model 3-17-3 cu secvența
ATTCACGAATATCACGTCCATC și următoarele modificări:

- 5'-*L*L*L*D*D*D*D*D*D*D*D*D*D*D*D*D*D*D*L*L*L*-3'

- 5'-L*L*L*D*5MC*D*D*D*D*D*D*5MC*D*D*D*D*5MC*D*L*L*L*-3'

Gapmer-ul ales prezintă 3 modificări intercalate de 5-metilcitozină în vederea creșterii afinității de legare la regiunile vulnerabile monocatenare ale miARN țintă, evitând în același timp, modificările de mare afinitate în situsurile de autohibridizare.

Structurile secundare ale țintelor miARN și ASO-urilor corespondente au fost calculate în vederea predicției situsurilor termodinamic labile ale țintelor miARN și predicției situsurilor de autohibridizare ASO.

Structura secundară a Hsa-mir-20a-5p

Structura secundară a ADN complementar

MFE = -2.40 kcal/mol (Figura 4.1.A))

ASO

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare

Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

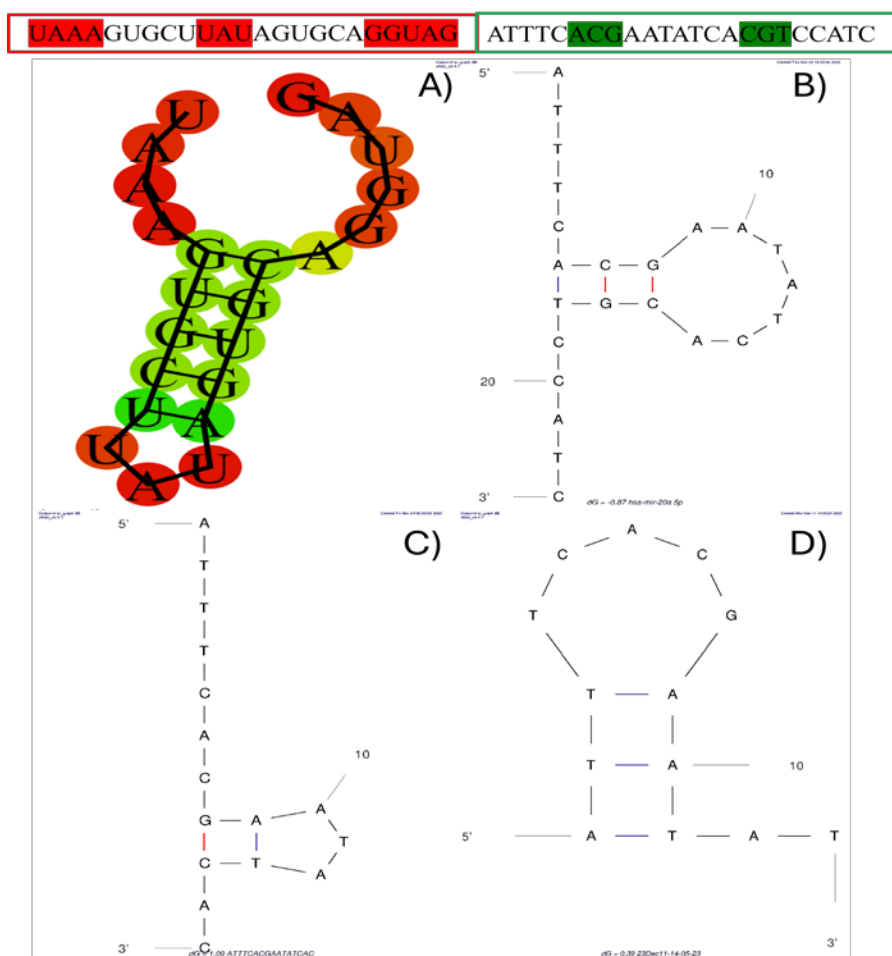


Figura 4.1. A) Structura secundară a Hsa-mir-20a-5p; B) Structura secundară ASO 23mer; C) Structura secundară ASO 16mer; D) Structura secundară ASO 13mer.

În figura 4.2. este reprezentat graficul profilului de probabilitate pentru pozițiile de legare ale ASO de ARN țintă. Acesta a fost calculat folosind funcția Soligo din cadrul Sfold. Graficul

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare

Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

arată variația probabilității de legare a ASO de-a lungul diferitelor poziții nucleotidice, de la 1 la 23, sub următoarele condiții: o temperatură de pliere de 37°C și condiții ionice de 1M NaCl, fără prezența ionilor divalenți. Pe axa x sunt reprezentate pozițiile nucleotidice, iar pe axa y este reprezentată probabilitatea, variind de la 0 la 1. Prin urmare, regiunile preferențiale de legare ale ASO de ARN țintă sunt la nucleotidele 1-4, 10-12 și, respectiv 19-23. Aceste variații sunt esențiale pentru proiectarea strategiilor de intervenție terapeutică la nivelul ARN.

Copyright © 2011 Wadsworth Bioinformatics Center

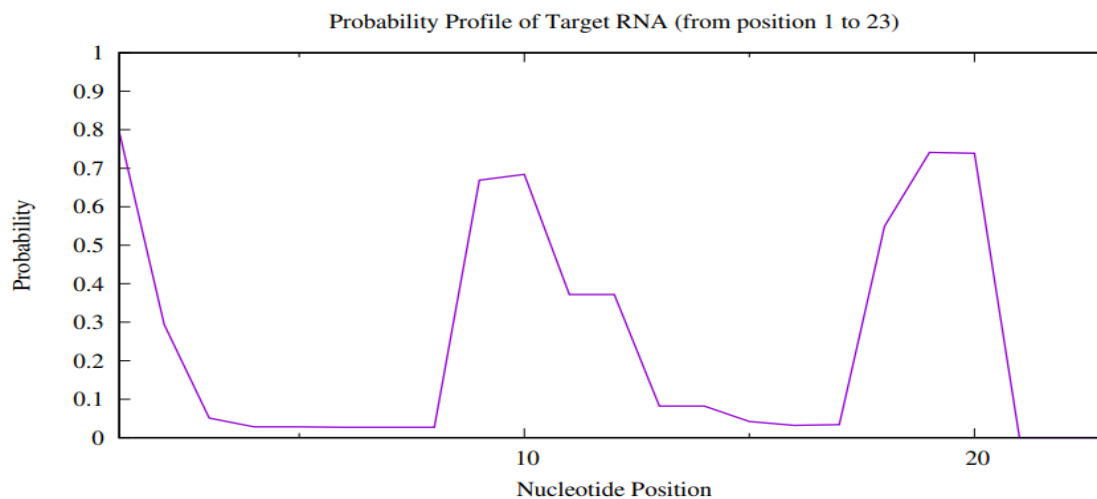


Figura 4.2. Profilul de probabilitate de legare pozițională ASO la ARN țintă calculat cu funcția Soligo din Sfold. Condiții: temperatura de pliere 37°C; condiții ionice NaCl 1M, fără ioni divalenți.

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare

Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

Rezultatele minimizării structurii terțiare a Hsa-mir-20a-5p (Figura. 4.3):

Minimum Free Energy = -2.40 kcal/mol (Figura 4.1.A)

----- cycle= 1000 ----- stepsize= 0.0001 -----

| Etotal =-363.323 grad(E)=0.647 E(BOND)=9.156 E(ANGL)=91.975 |

| E(IMPR)=9.835 E(VDW)=-268.418 E(ELEC)=-209.251 E(CDIH)=0.000 || E(NOE
)=1.334 E(PLAN)=2.046 |

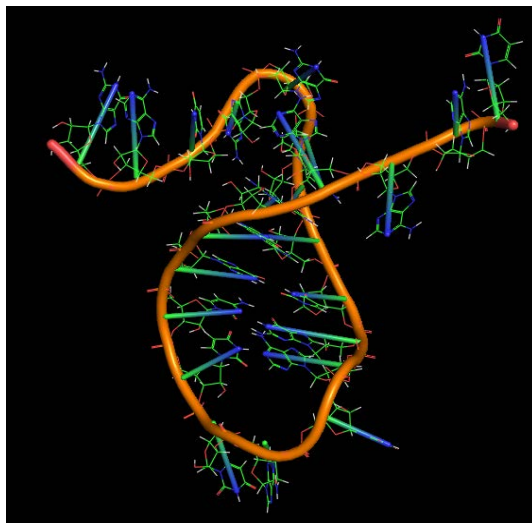


Figura 4.3. Structura terțiară a Hsa-mir-20a-5p.

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare

Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

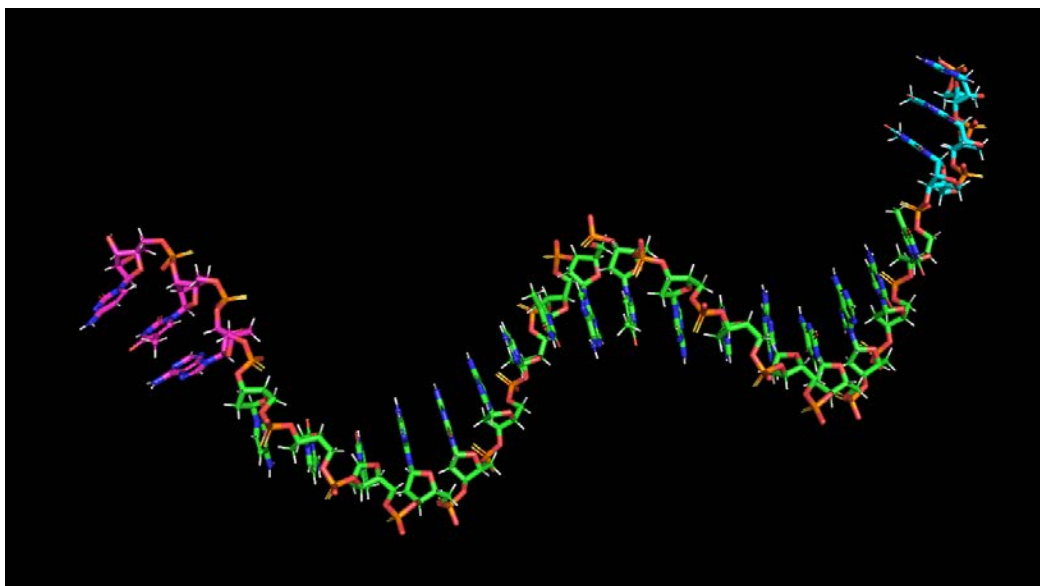


Figura 4.4. Structura terțiară a Gapmer-ului ASO 23mer prezintă flancuri LNA cu lungime de 3 nucleotide și schelet PS.

5'-*L*L*L*D*D*D*D*D*D*D*D*D*D*D*D*D*D*D*L*L*L*-3'
ATTTCACGAATATCACGTCCATC

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare

Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

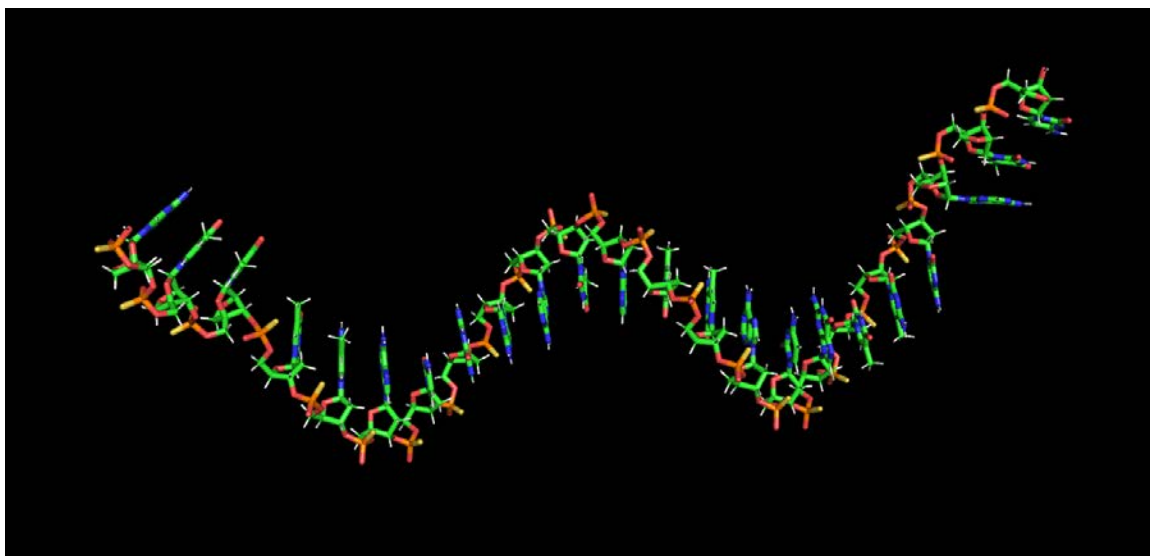


Figura 4.5. Structura terțiară a Gapmer-ului ASO 23mer prezintă flancuri LNA cu lungime de 3 nucleotide și schelet PS cu 3 grupări 5MC intercalate.

5'-*L*L*L*D*D*D*D*D*D*D*D*D*D*D*D*D*D*D*L*L*L*-3'

ATTTCACGAATATCACGTCCATC

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare

Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

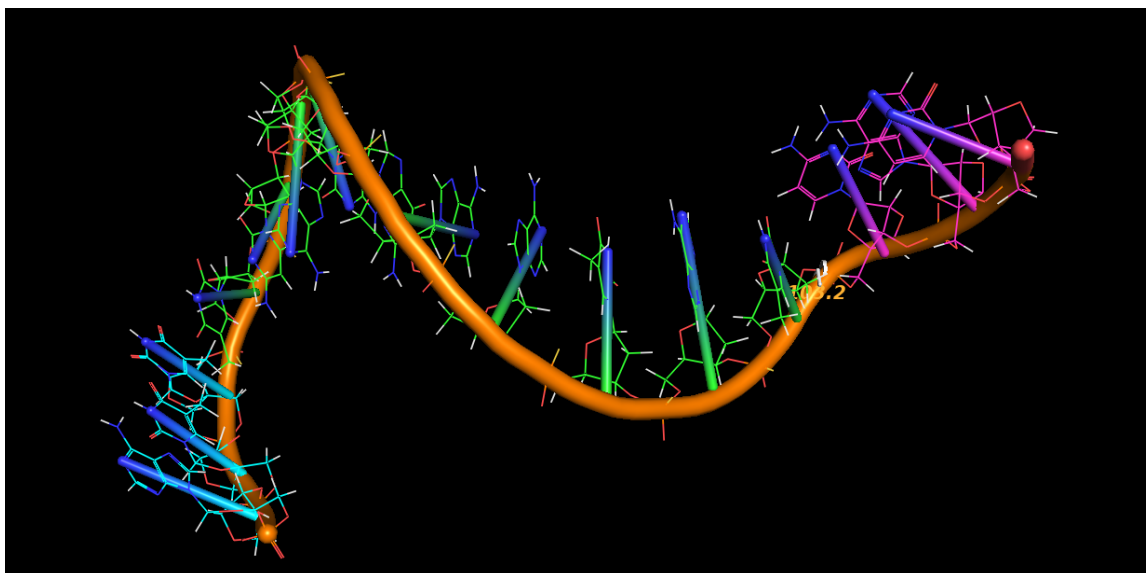


Figura 4.6. Structura terțiară a Gapmer-ului ASO 16 mer (3–10–3) prezintă flancuri LNA cu lungime de 3 nucleotide și schelet PS.

5'-*L*L*L*D*D*D*D*D*D*D*D*D*L*L*L*-3'

ATTTCACGAATATCAC

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare

Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

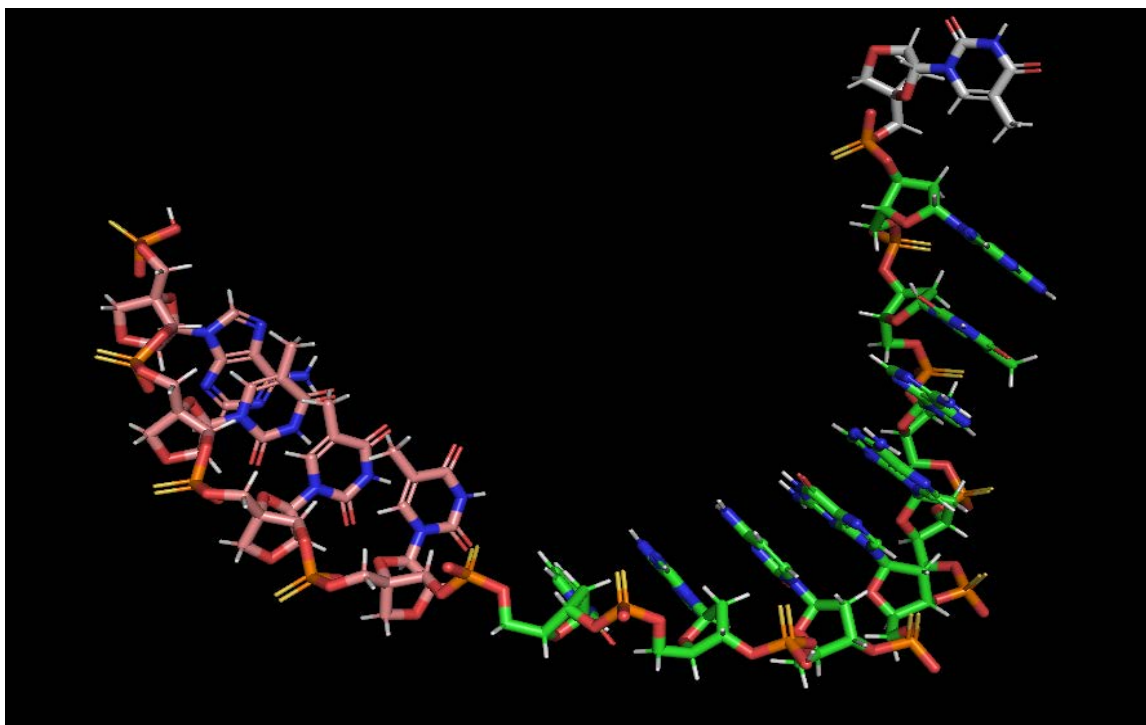


Figura 4.7. Structura terțiară a Gapmer-ului ASO 13mer cu flancuri de 4, respectiv 1 LNA, și schelet PS.

L*L*L*D*D*D*D*D*D*D*D*D*L

ATTTCACGAATAI

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare

Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

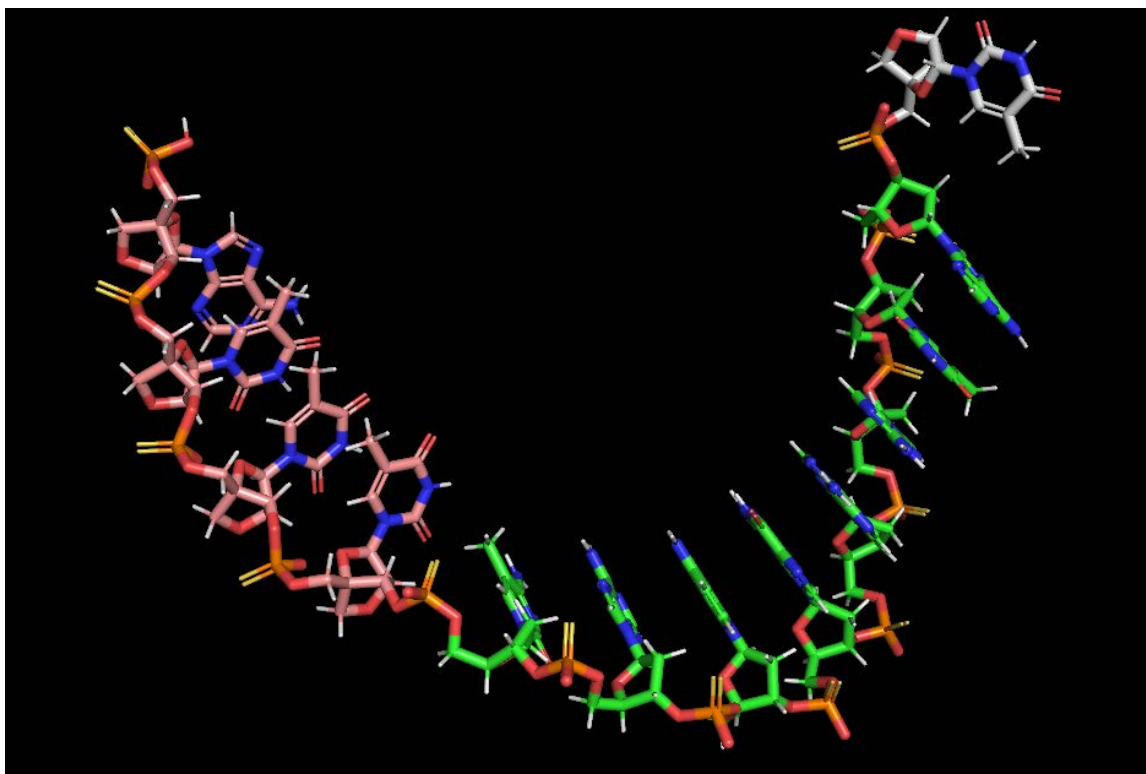


Figura 4.8. Structura terțiară a Gapmer-ului ASO 13mer cu flancuri de 4, respectiv 1 LNA, 1 grupare 5MC și schelet PS.

L*L*L*5MC*D*D*D*D*D*D*D*L

ATTTCACGAATAT

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare

Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

ASO PO de tipul 13mer au fost construite în vederea testării legării de grafene funcționalizate și comparării energiilor și situsurilor de legare cu secvențele lor complementare țintă miR-17 5p; hsa-miR-17 3p; hsa-miR-19a 5p; hsa-miR-20a 5p.

Energia totală (kcal/mol/nucleotidă) din datele prezentate este o măsură a energiei potențiale totale a unui conformer per nucleotidă. Este calculată ca sumă a tuturor termenilor de energie potențială luați în considerare în câmpul de forță MMFF94, inclusiv energia de legătură, energia unghiulară, energia de torsiune și energia Van der Waals. Conformerul cu cea mai mică energie totală este potențial cea mai stabilă structură.

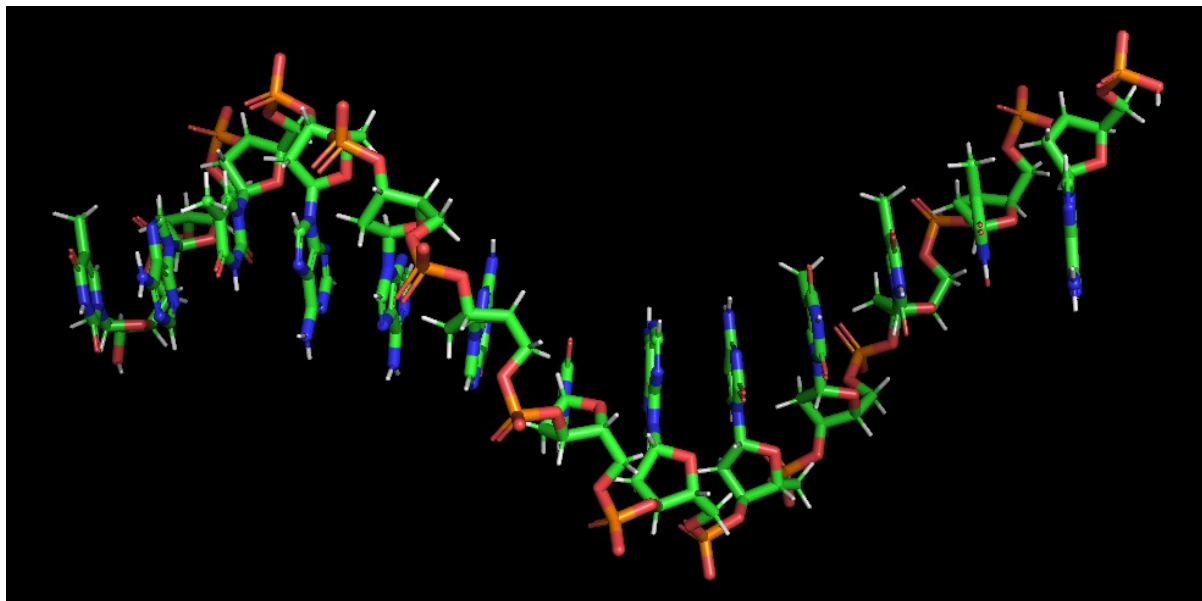


Figura 4.9. ADN PO antiMIR 20a.

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare

Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

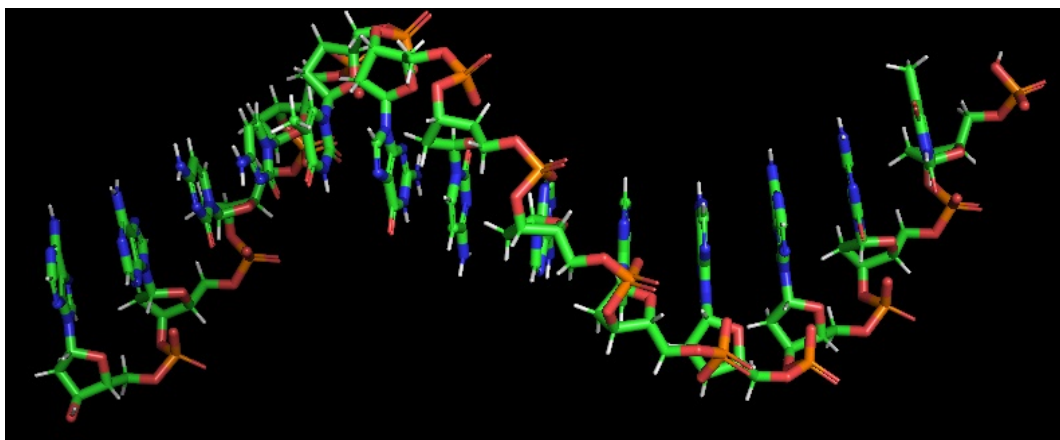


Figura 4.10. ADN PO antiMIR 19a 5p.

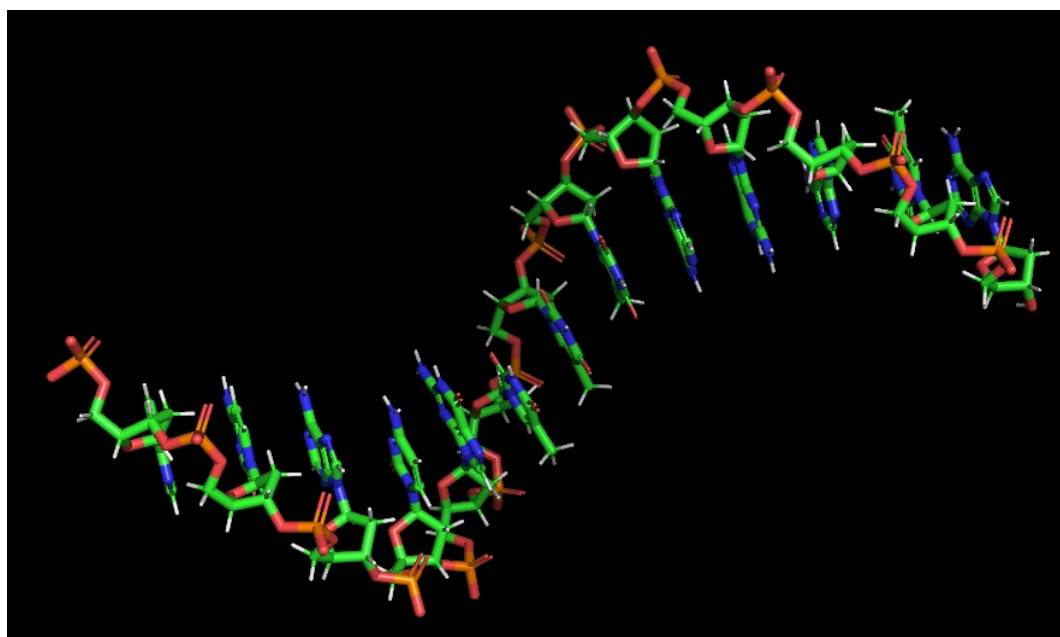


Figura 4.11. ADN PO antiMIR 19a 3p.

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare

Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

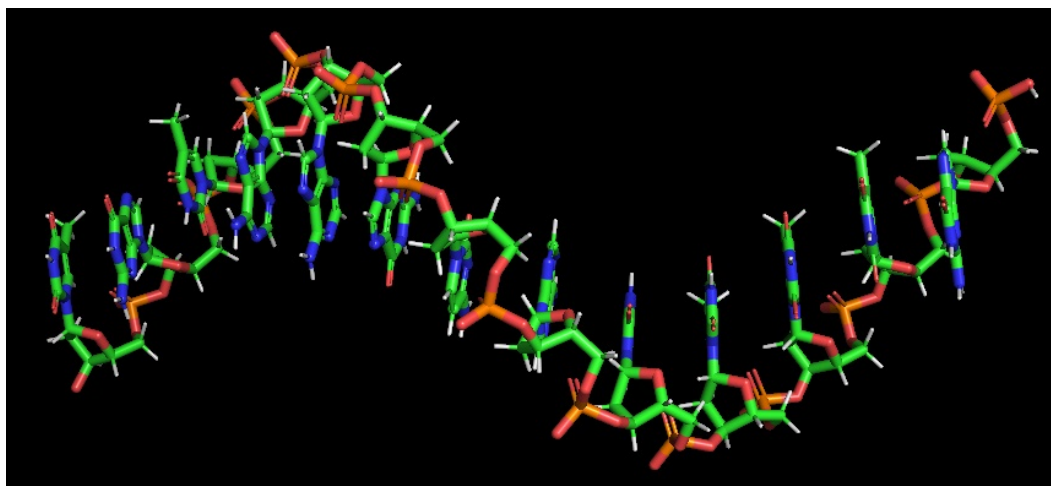


Figura 4.12. ADN PO antiMIR 17 5p

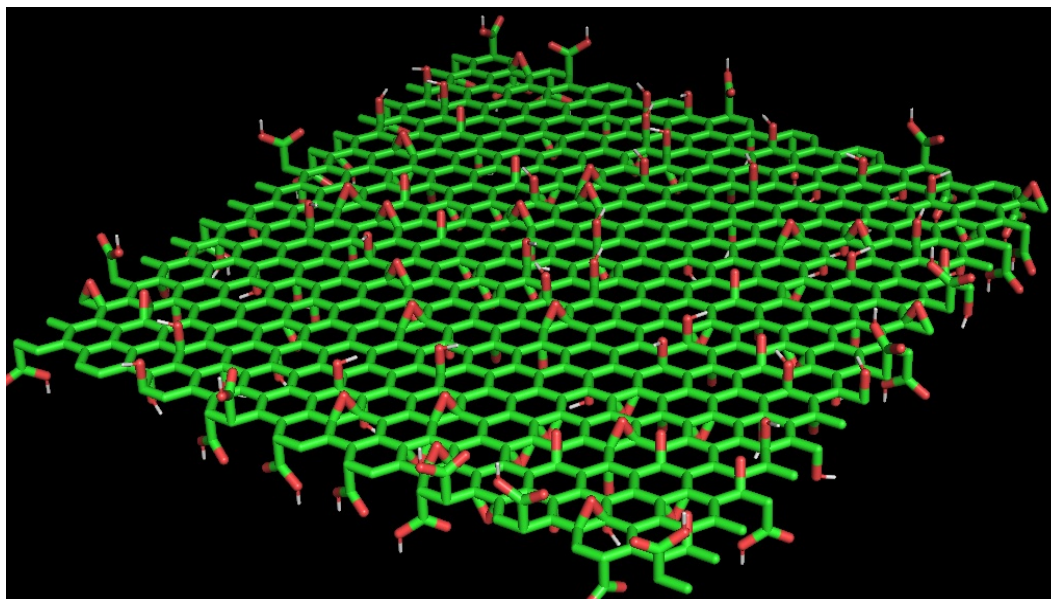


Figura 4.13. Model computațional al structurii GO.

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare

Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

Concluzii:

Pe baza structurilor secundare și terțiare minimizezate ale țintei Hsa-mir-20a-5p (Figura 4.1, Figura 4.3), și conform profilului de probabilitate de legare pozițională (Figura 4.2), s-au proiectat și modelat atomistic gapmerii 23mer (Figura 4.4, Figura 4.5), 16mer (Figura 4.6) și 13mer (Figura 4.7, Figura 4.8). Aceștia au fost funcționalizați cu flancuri LNA pentru a crește specificitatea, cu un schelet de fosforotioat integral modificat pentru a maximiza rezistența la exonucleaze, afinitatea de legare la ARN țintă și creșterea temperaturii de topire. Modificările intercalate de 5-metilcitozină au fost alese în vederea creșterii afinității de legare la regiunile vulnerabile monocatenare ale miARN țintă, evitând în același timp modificările de mare afinitate în situsurile de autohibridizare.

ASO PO de tipul 13mer au fost construite în vederea testării minimizezate cu câmpul de forțe MMFF94, iar conformația cu cea mai mică energie din ansamblu a fost aleasă în vederea testării prin simulări de dinamică moleculară a legării de grafene funcționalizate (Figura 4.13) și comparării energiilor și situsurilor de legare cu secvențele lor complementare, țintele miR-17 5p; hsa-miR-17 3p; hsa-miR-19a 5p; hsa-miR-20a 5p. ASO PO de tipul 13mer selectate sunt:

- antiMIR 20a (Figura 4.9) cu secvența ATTTCACGAATAT, energia totală = -7.250 (kcal/mol/nucleotide);

- antiMIR 19a 5p (Figura 4.10) cu secvența TCAAAACGTCCAA, energia totală = -4.051 (kcal/mol/nucleotide);

- antiMIR 19a 3p (Figura 4.11) cu secvența ACACGTTTAGATA, energia totală = 1.696 (kcal/mol/nucleotide); - antiMIR 17 5p (Figura 4.12) cu secvența GTTTCACGAATGT, energia totală = -18.169 (kcal/mol/nucleotide).

Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare

Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

Concluzii generale

În cadrul acestui trimestru s-au realizat progrese semnificative în dezvoltarea și caracterizarea formulărilor printabile, precum și în proiectarea nanoplatformelor pentru livrarea eficientă de ARNnc complementar. Sinteza și modificarea GelMA și GGMA au demonstrat fezabilitatea obținerii unor materiale cu proprietăți controlate, esențiale pentru aplicațiile de bio-printare 3D. Experimentele de printare 3D cu formulări variate au condus la stabilirea unor protocoale optimizate pentru formulările nanocompozite, facilitând fabricarea de structuri complexe și funcționale. Evaluarea proprietăților mecanice și caracterizarea materialului au oferit o înțelegere mai profundă a comportamentului și performanței formulărilor printabile. Investigații suplimentare pentru testarea stabilității, degradării și gonflării suporturilor realizate din formulările printabile utilizate în acest studiu se vor demara în decursul următorului trimestru.

În plus, dezvoltarea nanoplatformelor grafenice pentru livrarea de ASO a implicat simulări computaționale avansate, experimente de laborator și analize detaliate, evidențiind avantajele acestor sisteme în domeniul terapeutic.

Elaborarea și publicarea articolului științific cu titlul „Solid Phase Oligo-DNA Extraction from Complex Medium Using an Aminated Graphene/Nitrocellulose Nanoplatforme Hybrid” (<https://doi.org/10.3390/biom14030366>), acceptat în jurnalul Biomolecules, MDPI (I.F. 5.5) consolidează contribuția acestui studiu la avansarea cunoștințelor și aplicabilității practice în domeniul biotehnologiei și terapiilor bazate pe ASO. În plus, în următorul trimestru, se vor



MINISTERUL CERCETĂRII,
INOVĂRII ȘI DIGITALIZĂRII



Componenta: C9 Suport pentru sectorul privat, cercetare, dezvoltare și inovare

Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Titlul proiectului: Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma

efectua experimente suplimentare și se va fabrica și studia nanoplatforma NC/NH₂-PEG-rGO funcționalizată cu nanotuburi de carbon.

Avizat de responsabil de proiect,

Prof. Dr. Ing. Mariana Ionita