

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 consolidat

Perioada implementare aprilie-iunie 2026

Continuând direcțiile de cercetare dezvoltate în etapele anterioare, etapa actuală a proiectului REOSTEOMi a fost orientată către consolidarea bazei experimentale necesare validării substituenților osoși și a platformelor funcționale asociate regenerării osoase în contextul complicațiilor produse de mielomul multiplu. Activitățile desfășurate în perioada aprilie-iunie 2026 au urmărit atât optimizarea compozițională și structurală a biomaterialelor dezvoltate, cât și evaluarea răspunsului biologic, morfologic, mecanic și chimic al acestora prin metode complementare de caracterizare. Prin această abordare, etapa a urmărit corelarea proprietăților materialelor cu cerințele biologice și funcționale specifice aplicațiilor de inginerie tisulară osoasă.

În cadrul acestei perioade au fost continuate studiile privind dezvoltarea scaffoldurilor printabile și bioimprimabile pe bază de polimeri naturali, în special alginat, κ -caragenan, gelatină, nanofibre de celuloză, spirulină și derivați grafenici. Formulările investigate au fost proiectate pentru a asigura o arhitectură tridimensională adecvată, stabilitate structurală, compatibilitate cu procesele de printare 3D și capacitatea de a susține interacțiunea cu celulele relevante pentru regenerarea osoasă. În paralel, au fost dezvoltate și analizate sisteme pe bază de GelMA, GellanMA și oxid de grafenă, cu scopul de a obține hidrogeluri fotoreticulabile cu proprietăți adaptabile pentru aplicații de biofabricare și inginerie tisulară. O componentă importantă a etapei a fost reprezentată de inițierea, menținerea și pregătirea culturilor celulare utilizate pentru evaluarea biologică a materialelor dezvoltate. Au fost avute în vedere linii celulare cu relevanță pentru modelele osoase și pentru studiile de biocompatibilitate, precum MC3T3-E1, MG-63 și NIH-3T3. Prin utilizarea acestor modele celulare, s-a urmărit evaluarea capacității scaffoldurilor de a susține viabilitatea, adeziunea, proliferarea și organizarea celulară. Testele MTT și LDH au permis aprecierea activității metabolice și a citotoxicității probelor printate 3D pe bază de alginat, κ -caragenan și spirulină, aflate în contact direct cu

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

celule MC3T3-E1. Complementar, analizele Live/Dead, inclusiv prin microscopie confocală, au furnizat informații privind distribuția și supraviețuirea celulară în cadrul structurilor tridimensionale investigate. De asemenea, au fost realizate experimente de printare 3D utilizând formulări polimerice funcționalizate cu materiale de tip MXene. În cadrul acestor teste au fost evaluate diferite concentrații de MXene și au fost ajustați parametrii de printare, precum presiunea de extrudare, viteza de depunere și condițiile de formare a filamentului. Rezultatele preliminare au permis aprecierea comportamentului la printare și identificarea unor condiții adecvate pentru optimizarea ulterioară a scaffoldurilor funcționale.

Mai mult, caracterizarea morfologică a scaffoldurilor a fost realizată prin microscopie electronică de baleiaj, atât pentru probele fabricate prin printare 3D, cât și pentru probele post-implantare pe bază de gelatină, κ -caragenan, nanofibre de celuloză și oxid de grafenă funcționalizat cu grupări carboxil. Analizele SEM au permis evaluarea arhitecturii poroase, a topografiei de suprafață, a stabilității structurale și a modificărilor induse de contactul cu mediul biologic. Pentru probele post-implantare, caracterizarea morfologică a oferit informații relevante privind comportamentul scaffoldurilor după explantare, inclusiv posibile procese de remodelare, depunere de material biologic și integrare tisulară. Aceste date au fost completate de analizele FTIR, utilizate pentru identificarea grupărilor funcționale specifice matricei polimerice și pentru evidențierea modificărilor chimice apărute în probele pre- și post-implantare. În aceeași etapă, s-a realizat o evaluare mecanică preliminară a probelor pe bază de gelatină, κ -caragenan, nanofibre de celuloză și COOH-GO a contribuit la aprecierea stabilității structurale și a comportamentului la compresiune al scaffoldurilor. Pe lângă direcția principală privind scaffoldurile pentru regenerare osoasă, etapa a inclus și dezvoltarea unor sisteme preliminare pentru complexarea și transportul acizilor nucleici. Au fost obținuți și caracterizați dimensional poliplexi PEI/ADN și PBAE/ADN, utilizați ca modele pentru evaluarea interacțiunilor dintre polimeri cationici și ADN monocatenar funcționalizat. Aceste experimente contribuie la fundamentarea unor strategii de stabilizare și livrare a acizilor

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

nucleici, cu relevanță pentru substituenții osoși încărcăți cu GO-ASO și pentru structurile de tip cuști ADN prevăzute în cadrul proiectului.

Activitățile experimentale desfășurate în această etapă au fost completate de activități de redactare, analiză critică a literaturii, valorificare și diseminare științifică, orientate spre consolidarea direcțiilor de cercetare dezvoltate în cadrul proiectului REOSTEOMi. În acest sens, a fost elaborat un draft de brevet privind formulări bioimprimabile 3D pe bază de alginat, κ -caragenan, spirulină și celule osteoblaste, propuse ca suporturi funcționale bioactive pentru aplicații în regenerarea osoasă. În paralel, au fost continuate activitățile de redactare și revizuire a manuscrisului „Nanostructural Modulation of GelMA/GellanMA 3D Printed Scaffolds by Graphene Oxide: Implications for Printability and Cellular Response”, axat pe dezvoltarea scaffoldurilor printate 3D pe bază de GelMA/GellanMA și oxid de grafenă, cu evaluarea relației dintre compoziție, printabilitate, stabilitate structurală și răspuns celular. De asemenea, au fost dezvoltate și actualizate lucrări de tip review, incluzând „A Comprehensive Review on the Evolution of MXene Based Biomaterials in Tissue Engineering”, dedicată biomaterialelor pe bază de MXene pentru inginerie tisulară, și „Advances in Artificial Intelligence for 3D (Bio)Printing Tissue Regeneration: A State-of-the-Art Review”, orientată spre integrarea inteligenței artificiale în proiectarea, optimizarea și controlul proceselor de printare și bioprintare 3D pentru regenerare tisulară. Totodată, a fost realizat un studiu de literatură pentru elaborarea articolului „Advanced In Vitro Bone Tumor Microenvironment Models for Multiple Myeloma and Osteosarcoma: Cross-Diseased Frameworks and AI-Enabled Applications”, cu accent pe modelele in vitro ale microambientului tumoral osos în mielomul multiplu și osteosarcom și pe utilizarea abordărilor asistate de inteligență artificială. Activitățile de diseminare au inclus și dezvoltarea lucrării „Photophysical and Quenching Principles Governing Fluorescence-Based (Nano)Biosensors: Materials, Mechanisms, and Analytical Performance”, privind biosenzorii fluorescenți, materialele funcționale, mecanismele de quenching și metodele moderne de analiză a semnalului, precum și înaintarea manuscrisului

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

„AI-guided safe-by-design Functional Intelligent Materials” către Nature Communications. Prin aceste activități, rezultatele experimentale au fost integrate într-un cadru științific mai larg, contribuind la consolidarea fundamentului conceptual al proiectului, la valorificarea rezultatelor obținute și la creșterea vizibilității științifice a direcțiilor dezvoltate în cadrul REOSTEOMi.

Prin rezultatele obținute în perioada aprilie-iunie 2026, proiectul REOSTEOMi avansează în direcția validării integrate a unor substituenți osoși cu arhitectură controlată, compoziție funcțională și răspuns biologic favorabil. Datele generate oferă suport pentru selecția formulărilor cu potențial ridicat, pentru optimizarea parametrilor de printare și bioimprimare 3D și pentru pregătirea etapelor ulterioare de validare *in vitro* și *in vivo*. În ansamblu, această etapă contribuie la dezvoltarea unor soluții personalizate pentru regenerarea osoasă și pentru abordarea complicațiilor asociate mielomului multiplu, prin integrarea biomaterialelor avansate, a tehnologiilor de fabricație aditivă și a metodelor moderne de evaluare biologică și funcțională. Prin urmare, activitățile de cercetare desfășurate în această etapă sunt integrate în mod strategic în etapele următoare ale planului de realizare al proiectului:

Activitatea 3. Validarea *in vivo* a eficienței dispozitivelor REOSTEOMi

Subactivitatea 3.1. Validarea substituenților osoși în modele de șoarece.

- Efectuarea de studii de literatură privind elaborarea articolului cu titlu "Advanced In Vitro Bone Tumor Microenvironment Models for Multiple Myeloma and Osteosarcoma: Cross-Diseased Frameworks and AI-Enabled Applications".
- Efectuarea de experimente de laborator pentru modificarea gelatinei cu grupări metacrilice (GelMA).
- Efectuarea de experimente de laborator pentru modificarea gumei gellan cu grupări metacrilice (GellanMA).
- Efectuarea de experimente de laborator privind printarea 3D cu formulări pe bază de GelMA și GellanMA.

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

- Efectuarea de experimente de laborator privind printarea 3D cu formulări pe bază de GelMA, GellanMA și 0.125%, 0.25% și 0.5% oxid de grafenă (GO).
- Efectuarea unor proceduri de dezghețare și inițiere a culturilor celulare MC3T3-E1 și MG63.
- Efectuarea unor proceduri de pasaj celular pentru liniile MG63 și MC3T3-E1.
- Elaborarea articolului review draft "Advances in Artificial Intelligence for 3D Printing Tissue Regeneration: A State-of-the-Art Review"
- Efectuarea unor proceduri însămânțare celulară folosind linia MG63 pe probele printate 3D cu formulări pe bază de GelMA, GellanMA și 0-0.50% GO pentru marcarea Live/Dead și vizualizare prin microscopie confocală la o zi, cinci, șapte și paisprezece zile
- Efectuarea și interpretarea de teste de biocompatibilitate (MTT și LDH) după o zi, două și la cinci zile pentru probele printate 3D cu formulări pe bază de k-caragenan, alginat și 0-1%, aflate în contact direct cu celule MC3T3-E1.
- Efectuarea experimente de laborator privind realizarea de formulări printabile și de printare 3D folosind pectina, gelatina metacrilată, LAP și MXene

Subactivitatea 3.2. Evaluarea *in vivo* a biodisponibilității substituenților osoși încărcăți cu GO-ASO și a cuștilor ADN la nivel sistemic în modele de șoarece BALB/c cu MM indus.

- Modificarea, corectarea și adaptarea articolului „Photophysical and Quenching Principles Governing Fluorescence-Based (Nano)Biosensors: Materials, Mechanisms, and Analytical Performance”, precum și elaborarea cover letter-ului și a documentelor necesare pentru platforma de submission, în vederea înaintării spre publicare. Pentru acest manuscris au fost realizate mai multe etape de pregătire și încercări de înaintare către reviste științifice de profil, ultima depunere fiind realizată către jurnalul Materials Horizons, cu factor de impact 11,9.

-Obținerea și caracterizarea dimensională a poliplexilor PEI/ADN și PBAE/ADN pentru sisteme de livrare a acizilor nucleici în cadrul proiectului REOSTEOMi

Subactivitatea 3.3. Investigarea *in vivo* a inducerii formării de țesut osos în șoareci osteoporotici de către factorii terapeutici rezultați din Activitățile 1 și 2.

- Studiu de literatură privind elaborarea lucrării cu titlul „Mxene-based materials in the medical

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

field”.

- Efectuarea unor proceduri însămânțare celulară folosind linia MC3T3-E1 pe probele printate 3D cu formulări pe bază de k-caragenan, alginat și 0-1% spirulină pentru testarea biocompatibilității.
- Analiza rezultatelor obținute în cadrul Etapei III a serviciilor in vivo externalizate către Universitatea de Vest „Vasile Goldiș” din Arad au fost analizate pentru evaluarea comportamentului biologic și a potențialului osteogenic al biomaterialelor pe bază de grafenă funcționalizate cu BMP în diferite condiții, implantate ectopic in vivo, prin corelarea analizelor histopatologice, histochimice, imunofluorescente și moleculare privind expresia markerilor specifici osteogenezei.

Subactivitatea 3.4. Controlul funcțional și de calitate al componentelor Activității 3.

- Elaborarea cover letter și documentelor de răspuns către recenzenți, care detaliază modificările și clarificările aduse manuscrisului „Comparative molecular insights and in silico computational modeling on multiple myeloma and osteosarcoma”, în vederea publicării în jurnalul International Journal of Molecular Sciences I.F. 4.9.
- Realizarea proof-ului pentru articolul „Comparative molecular insights and in silico computational modeling on multiple myeloma and osteosarcoma”, în urma acceptării în jurnalul International Journal of Molecular Sciences I.F. 4.9
- Efectuarea de analize de morfologie de suprafață și secțiune, prin microscopie electronică de baleiaj (SEM), pe probele printate 3D cu formulări conținând diferite concentrații de alginat, K-caragenan și spirulină
- Prelucrarea, analiza și corectarea datelor experimentale în vederea elaborării brevetului european cu titlul „Formulare imprimabilă și/sau bioimprimabilă 3D pe bază de alginat, κ-caragenan și spirulină și protocolul/metoda de obținere a unui suport funcțional”, prin integrarea rezultatelor obținute în urma studiilor de formulare, printare 3D și evaluare preliminară a suporturilor funcționale dezvoltate. Brevetul european a fost depus cu prioritatea A 2025 00577/13.12.2025, având termen EPO 26.06.2026 și referința internă 21epo/2026.
- Analiza finală, verificarea coerenței conținutului și pregătirea pentru depunere a propunerilor de

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

proiect european „New Engineering Solutions for Healthcare” (NESH), Proposal ID SEP-211271885, depusă în cadrul call-ului MSCA Staff Exchanges, și „AI-designed Advanced Materials for Environmental Sensing” (AIMSENS), propunere de tip HORIZON-RIA aferentă call-ului HORIZON-CL4-2026-05-MAT-PROD-25.

- Realizarea modificărilor articolului cu titlul „Nanostructural Modulation of GelMA/GellanMA 3D Printed Scaffolds by Graphene Oxide: Implications for Printability and Cellular Response”, conform observațiilor formulate de editori și recenzenti, precum și elaborarea cover letter-ului necesar pentru înaintarea manuscrisului spre publicare în jurnalul Materials Today Advances, cu factor de impact 8,0.

- Analiza mecanică a probelor pe bază de gelatină, K-caragenan, CNFs și COOH-GO

- Analize de morfologie de suprafață, prin microscopie electronică de baleiaj (SEM), pe probelor explantate din model murin conținând scaffold-uri cu gelatina, K-caragenan, nanofibre de celuloză și oxid de grafena functionalizat cu grupari carboxil (COOH-GO)

- Analize de compoziție chimică prin spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier (FTIR) pe probe pe bază de gelatină, κ-caragenan, CNF, COOH-GO, EDC/NHS și BMP, înainte și după implantare.

- Analize de compoziție chimică prin spectroscopie fotoelectroni cu radiații X de pe probe pe bază de gelatină, κ-caragenan, CNF, COOH-GO, EDC/NHS și BMP după implantare.

- Evaluarea biocompatibilității structurilor din gelatină, K-carragenan, nanofibre de celuloză și COOH-GO, prin testare Live/Dead

-Elaborarea articolului de tip review “AI-guided safe-by-design Functional Intelligent Materials” și transmiterea lui către jurnalul Nature Communication cu I.F 14.7

- Elaborarea propunerii de proiect cu titlul " AIMPRINT AI-driven xDesign and 3D/4D Printing of Functional Intelligent Biomaterials for Regenerative Medicine".

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

I.1. CAPITOL 1

I.1. Caracterizarea morfologică a scaffoldurilor fabricate prin printare 3D utilizând microscopia electronică de baleiaj (SEM)

Activitatea 3. Validarea in vivo a eficienței dispozitivelor REOSTEOMi

Subactivitatea 3. 4. Controlul funcțional și de calitate al componentelor Activității 3.

I. 1. 1. Introducere

Regenerarea țesutului osos reprezintă una dintre principalele provocări ale medicinei regenerative și ingineriei tisulare, considerând capacitatea limitată de vindecare a defectelor osoase de dimensiuni mari rezultate în urma traumatismelor, infecțiilor, afecțiunilor degenerative sau rezecțiilor tumorale. În acest context, scaffold-urile tridimensionale (3D) au atras un interes considerabil datorită potențialului lor de a oferi un suport pentru adeziunea, proliferarea și diferențierea celulară, facilitând astfel formarea de țesut osos nou și integrarea acestuia în organism [1], [2]. Printarea 3D a devenit una dintre cele mai promițătoare tehnologii pentru fabricarea scaffoldurilor destinate regenerării osoase, datorită capacității sale de a produce structuri cu geometrii complexe și proprietăți adaptate aplicației biologice vizate. Performanța unui scaffold este influențată semnificativ de caracteristicile sale morfologice, precum dimensiunea și distribuția porilor, interconectivitatea acestora, rugozitatea suprafeței și fidelitatea structurală. Aceste proprietăți joacă un rol esențial în transportul nutrienților și oxigenului, eliminarea metaboliților, vascularizarea țesutului nou format și migrarea celulară, toate fiind procese critice pentru succesul regenerării osoase [3], [4]. Astfel, caracterizarea morfologică a scaffoldurilor reprezintă o etapă indispensabilă în evaluarea capacității acestora pentru aplicații biomedicale. Dintre tehnicile disponibile, microscopia electronică de baleiaj

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

(SEM) este una dintre cele mai utilizate metode datorită rezoluției ridicate și capacității sale de a furniza informații detaliate privind topografia suprafeței și microstructura materialelor. Analiza SEM permite investigarea formei și dimensiunii porilor, a uniformității structurii, a defectelor de fabricație și a interacțiunilor dintre diferitele componente ale biomaterialului, oferind informații esențiale pentru optimizarea formulărilor și a parametrilor de imprimare [5], [6]. În cazul scaffoldurilor destinate regenerării osoase, controlul porozității este deosebit de important, deoarece aceasta influențează atât proprietățile biologice, cât și performanța mecanică a constructului. O porozitate adecvată favorizează infiltrarea celulară și formarea de țesut nou, în timp ce menținerea integrității structurale este necesară pentru susținerea zonei defectului pe durata procesului de regenerare [7], [8]. În cadrul acestui studiu, au fost investigate scaffolduri fabricate prin printare 3D pe bază de alginat de sodiu, κ -carragenan și spirulina, utilizând diferite concentrații ale acestora, cu scopul de a evalua influența variațiilor de compoziție asupra caracteristicilor morfologice și a porozității scaffoldurilor obținute.

I.1.2. Matertiale și metode

Au fost investigate șase tipuri de scaffolduri fabricate prin printare 3D prin extrudare, utilizând formulări pe bază de alginat de sodiu și κ -carragenan, în rapoarte masice de 1:1 și 2:1. Pentru evaluarea influenței asupra caracteristicilor morfologice, în fiecare formulare au fost încorporate concentrații diferite de spirulina (0%, 0,5% și 1,0% w/v). Scaffoldurile au fost codificate după cum urmează: AK11, AK11-0.5 și AK11-1.0 pentru raportul alginat: κ -carragenan de 1:1 și, respectiv, AK21, AK21-0.5 și AK21-1.0 pentru raportul de 2:1.

Caracterizarea morfologică a scaffoldurilor a fost realizată prin SEM, atât la nivelul suprafeței, cât și în secțiune. Înainte de analiză, probele au fost acoperite cu un strat de aur cu grosimea de aproximativ 6 nm utilizând echipamentul LUXOR Au/Pt Coating Equipment (IB-FT GmbH, Berlin, Germany), pentru a asigura conductivitatea electrică necesară examinării SEM.

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

Imaginile SEM au fost obținute utilizând microscopul Hitachi TM4000Plus II (Hitachi, Tokyo, Japan), controlat prin intermediul software-ului TM4000 (versiunea 1.5). Analizele au fost efectuate în modul de operare pentru probe conductoare, utilizând semnale de electroni retrodifuzați (Backscattered Electrons) și o tensiune de accelerare de 15 kV. Imaginile obținute au fost utilizate pentru evaluarea calitativă a morfologiei, a distribuției porilor și a modificărilor structurale induse de variația compoziției scaffoldurilor.

I.1.3. Rezultate și discuții

Analiza morfologică a evidențiat modificări semnificative ale arhitecturii filamentelor și ale topografiei suprafeței în funcție de compoziția formulării, confirmând influența majoră a compoziției asupra fidelității de printare și a caracteristicilor structurale finale ale constructelor. Imaginile de suprafață prezentate în Figura 1 permit evaluarea fidelității filamentelor depuse și a uniformității rețelei printate. Scaffoldurile fără spirulină (AK11 și AK21) au prezentat filamente cu dimensiuni neuniforme și variații considerabile ale diametrului acestora. În cazul probei AK11, diametrul filamentelor a variat între 742 și 1120 μm , în timp ce pentru AK21 valorile s-au situat între 586 și 951 μm . În plus, aceste formulări au prezentat numeroase fisuri și defecte superficiale distribuite de-a lungul filamentelor, indicând o stabilitate structurală redusă după procesul de imprimare și uscare. Prezența acestor defecte poate fi asociată cu contracția neuniformă a hidrogelului și cu distribuția heterogenă a tensiunilor interne generate în timpul proceselor de gelificare și deshidratare.

Odată cu introducerea spirulinei în formulare, se observă o îmbunătățire progresivă a morfologiei filamentelor. Scaffoldurile care conțin 1.0% spirulină (AK11-1.0 și AK21-1.0) prezintă filamente continue, bine definite și semnificativ mai uniforme din punct de vedere dimensional. Diametrele medii ale filamentelor au fost de $405 \pm 41 \mu\text{m}$ pentru AK11-1.0 și $424 \pm 36 \mu\text{m}$ pentru AK21-1.0, valori considerabil mai apropiate de dimensiunile proiectate în modelul teoretic comparativ cu formulările fără spirulină. Reducerea variațiilor dimensionale și diminuarea numărului de fisuri observate la suprafață sugerează că prezența spirulinei

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

contribuie la îmbunătățirea proprietăților reologice ale sistemului polimeric și la stabilizarea procesului de extrudare.

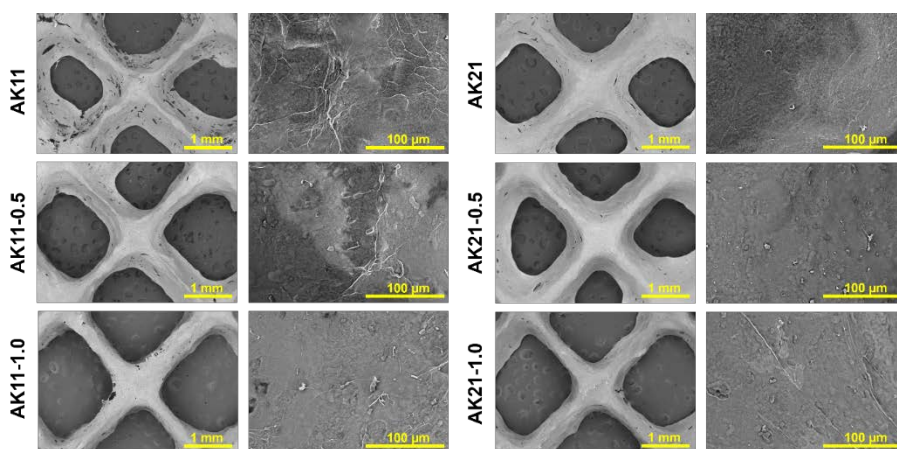


Figura 1. Imagini SEM de suprafață ale probelor cu diferite concentrații de alginat de sodiu, κ -carragenan și spirulina la magnificație $30\times$ și scală de 1 mm și la magnificație $100\times$ și scală de 100 μm .

Analiza imaginilor SEM în secțiune (Figura 2) a evidențiat existența unei structuri poroase interconectate în toate formulările investigate, independent de raportul alginat: κ -carragenan sau de concentrația de spirulină. Această caracteristică este deosebit de importantă pentru aplicațiile de regenerare osoasă, deoarece porozitatea interconectată facilitează migrarea celulară, colonizarea întregului volum al scaffoldului, vascularizarea și transportul eficient al nutrienților și metaboliților. De asemenea, porii observați sunt distribuiți uniform în structura constructelor, indicând o bună reproducibilitate a procesului de printare și o arhitectură internă adecvată pentru utilizarea ca substituenți osoși. La magnificații mai mari, imaginile SEM au evidențiat modificări importante ale topografiei pereților porilor. Scaffoldurile care conțin concentrații crescute de spirulină prezintă suprafețe mai rugoase comparativ cu formulările control. Această creștere a rugozității poate fi atribuită particulelor și componentelor bioactive provenite din spirulină, care generează o microtopografie mai complexă la nivelul suprafeței materialului. Din punct de vedere biologic, această caracteristică este deosebit de avantajoasă, deoarece numeroase studii au demonstrat că suprafețele rugoase favorizează adsorbția

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

proteinelor, adeziunea celulară și organizarea citoscheletului, stimulând ulterior proliferarea și diferențierea celulară. În contextul regenerării osoase, o astfel de microstructură poate contribui la îmbunătățirea osteoconductivității scaffoldurilor și la accelerarea proceselor de formare a țesutului osos nou.

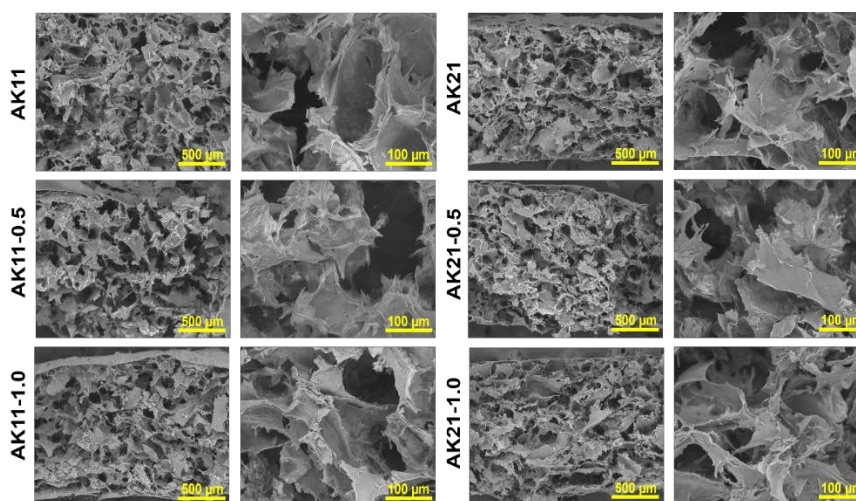


Figura 2. Imagini SEM în secțiune ale probelor cu diferite concentrații de alginat de sodiu, κ -carragenan și spirulina la magnificație $60\times$ și scală de $500\ \mu\text{m}$ și la magnificație $300\times$ și scală de $100\ \mu\text{m}$.

I.1.4. Concluzii

Rezultatele obținute în urma caracterizării morfologice prin SEM au evidențiat influența semnificativă a compoziției scaffoldurilor asupra arhitecturii structurale și a caracteristicilor de suprafață, parametri esențiali pentru performanța biomaterialelor destinate regenerării osoase. Analiza comparativă a scaffoldurilor fabricate din diferite rapoarte de alginat de sodiu și κ -carragenan, în combinație cu concentrații variabile de spirulină, a demonstrat că modificarea formulării poate conduce la îmbunătățirea semnificativă a fidelității de imprimare și a proprietăților morfologice ale constructelor finale. Imaginile SEM de suprafață au evidențiat diferențe importante între probele fără spirulină și cele care conțin. Scaffoldurile AK11 și AK21, care nu au inclus spirulină în compoziție, au prezentat filamente cu dimensiuni neuniforme, variații pronunțate ale diametrului și un număr ridicat de fisuri

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

superficiale. Aceste caracteristici indică o stabilitate redusă a structurii după procesul de printare și sugerează existența unor fenomene de contracție și deformare asociate procesului de gelificare și uscare. În contrast, introducerea spirulinei în formulare a determinat o îmbunătățire progresivă a uniformității filamentelor, reducerea defectelor structurale și o mai bună menținere a geometriei proiectate. În special, formulările care conțin 1.0% spirulină au generat filamente continue, omogene și bine definite, cu variații dimensionale reduse și o fidelitate superioară față de modelul teoretic inițial. Aceste observații confirmă faptul că spirulina nu acționează exclusiv ca ingredient bioactiv, ci contribuie și la optimizarea proprietăților fizico-chimice și reologice ale sistemului polimeric. Îmbunătățirea comportamentului la extrudare și a stabilității filamentelor sugerează existența unor interacțiuni favorabile între componentele formulării, care permit obținerea unor structuri mai stabile și mai reproductibile. Din perspectiva fabricării scaffoldurilor prin printare 3D, această caracteristică este deosebit de importantă, deoarece fidelitatea dimensională și integritatea structurală reprezintă criterii esențiale pentru reproducerea precisă a arhitecturilor necesare regenerării țesuturilor.

Analiza secțiunilor transversale a demonstrat că toate scaffoldurile investigate prezintă o structură poroasă tridimensională bine dezvoltată și un grad ridicat de interconectivitate a porilor. Menținerea acestei arhitecturi indiferent de concentrația de spirulină reprezintă un rezultat deosebit de relevant, deoarece porozitatea interconectată constituie una dintre cele mai importante cerințe pentru substituenții osoși utilizați în ingineria tisulară. O astfel de structură facilitează migrarea și distribuția uniformă a celulelor în întregul volum al scaffoldului, favorizează vascularizarea țesutului nou format și permite transportul eficient al nutrienților, oxigenului și metaboliților. În plus, distribuția uniformă a porilor observată în toate formulările sugerează că procesul de printare utilizat este capabil să genereze structuri cu o arhitectură internă reproductibilă și adecvată aplicațiilor biomedicale. Un alt aspect important evidențiat de imaginile SEM la magnificații ridicate este modificarea topografiei suprafeței odată cu

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

creșterea concentrației de spirulină. Scaffoldurile care conțin cantități mai mari de spirulină au prezentat o rugozitate mai accentuată atât la nivelul filamentelor, cât și pe suprafața pereților porilor. Această caracteristică este considerată benefică pentru aplicațiile de regenerare osoasă, deoarece numeroase studii au demonstrat că micro- și nanotopografia suprafeței influențează direct comportamentul celular. Suprafețele rugoase favorizează adsorbția proteinelor din mediul biologic, cresc numărul punctelor de ancorare celulară și stimulează procesele de adeziune, proliferare și diferențiere osteogenică. Astfel, creșterea rugozității observată în cazul scaffoldurilor cu spirulină poate contribui la îmbunătățirea răspunsului biologic și la accelerarea proceselor de regenerare osoasă. În ansamblu, rezultatele obținute demonstrează că incorporarea spirulinei influențează semnificativ morfologia filamentelor și caracteristicile suprafeței scaffoldurilor, fără a afecta negativ arhitectura poroasă interconectată a constructelor. Dimpotrivă, prezența spirulinei conduce la îmbunătățirea uniformității filamentelor, la reducerea defectelor structurale și la creșterea rugozității suprafeței, caracteristici asociate cu o performanță superioară atât din punct de vedere al procesului de fabricație, cât și al funcționalității biologice. Dintre toate formulările investigate, scaffoldurile care conțin 1.0% spirulină au prezentat cea mai favorabilă combinație de proprietăți morfologice, caracterizată prin filamente uniforme, integritate structurală ridicată, porozitate interconectată bine conservată și o topografie superficială favorabilă interacțiunilor celulare. Aceste rezultate sugerează că utilizarea spirulinei în concentrații adecvate reprezintă o strategie promițătoare pentru dezvoltarea de scaffolduri funcționale destinate regenerării osoase. Prin urmare, formulările AK11-1.0 și AK21-1.0 pot fi considerate candidați relevanți pentru investigații viitoare privind proprietățile mecanice, comportamentul de degradare, biocompatibilitatea și capacitatea de susținere a osteogenezei, în vederea validării potențialului lor pentru aplicații clinice în ingineria țesutului osos.

I.1.5 Bibliografie

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

- [1] W. Paul and C. P. Sharma, “Tissue and organ regeneration: An introduction,” *Regenerated Organs: Future Perspectives*, pp. 3–9, Jan. 2021, doi: 10.1016/B978-0-12-821085-7.00001-4.
- [2] P. G. Ray *et al.*, “Engineered surfaces: A plausible alternative in overlooking critical barriers for reconstructing modern therapeutics or biomimetic scaffolds,” *Regenerated Organs: Future Perspectives*, pp. 39–80, Jan. 2021, doi: 10.1016/B978-0-12-821085-7.00003-8.
- [3] Y. Bai *et al.*, “Recent progress of 3D printed responsive scaffolds for bone repair: A review,” *Mater. Today Bio*, vol. 35, p. 102351, Dec. 2025, doi: 10.1016/J.MTBIO.2025.102351.
- [4] M. Mirkhalaf, Y. Men, R. Wang, Y. No, and H. Zreiqat, “Personalized 3D printed bone scaffolds: A review,” *Acta Biomater.*, vol. 156, pp. 110–124, Jan. 2023, doi: 10.1016/J.ACTBIO.2022.04.014.
- [5] D. Iandolo *et al.*, “Electron Microscopy for 3D Scaffolds–Cell Biointerface Characterization,” *Adv. Biosyst.*, vol. 3, no. 2, p. e1800103, Feb. 2018, doi: 10.1002/ADBI.201800103.
- [6] X. Yuan *et al.*, “Recent Advances in 3D Printing of Smart Scaffolds for Bone Tissue Engineering and Regeneration,” *Advanced Materials*, vol. 36, no. 34, Aug. 2024, doi: 10.1002/ADMA.202403641.
- [7] V. Karageorgiou and D. Kaplan, “Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis,” *Biomaterials*, vol. 26, no. 27, pp. 5474–5491, Sep. 2005, doi: 10.1016/J.BIOMATERIALS.2005.02.002.
- [8] M. Koch and M. K. Włodarczyk-Biegun, “Faithful scanning electron microscopic (SEM) visualization of 3D printed alginate-based scaffolds,” *Bioprinting*, vol. 20, p. e00098, Dec. 2020, doi: 10.1016/J.BPRINT.2020.E00098.

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

Capitolul 2

I.2. Sinteza de gelatină metacrilată și gelan metacrilat

Activitatea 3. Validarea in vivo a eficienței dispozitivelor REOSTEOMi

Subactivitatea 3.3. Investigarea in vivo a inducerii formării de țesut osos în șoareci osteoporotici de către factorii terapeutici rezultați din Activitățile 1 și 2

I.2.1. Introducere

Hidrogelurile sunt definite ca rețele polimerice hidrofile capabile să absoarbă și să rețină cantități mari de apă sau fluide biologice, menținând totodată integritatea structurală. Arhitectura lor de rețea este stabilizată prin reticulare covalentă (chimică) sau non-covalentă (fizică) și este îmbogățită cu grupări funcționale hidrofile precum hidroxil (–OH), carboxil (–COOH), amidă (–CONH₂) și amino (–NH₂). Datorită acestor caracteristici, hidrogelurile au suscitat un interes considerabil în ingineria biomedicală, prin capacitatea lor de a mima îndeaproape matricea extracelulară (MEC), de a susține interacțiunile celulare și de a oferi medii mecanice și biochimice personalizabile. Biocompatibilitatea, conținutul ridicat de apă, viscoelasticitatea și răspunsul la stimuli precum pH-ul, temperatura sau forța ionică permit controlul precis al comportamentului hidrogelurilor în condiții fiziologice, acestea fiind utilizate pe scară largă în sisteme de eliberare controlată a medicamentelor, matrice pentru vindecarea plăgilor, dispozitive medicale implantabile și scaffold-uri pentru ingineria tisulară și medicina regenerativă [1], [2].

Gelatina este un biopolimer derivat din collagen, obținut prin denaturarea parțială a acestuia, și reprezintă unul dintre materialele de bază cel mai frecvent utilizate în ingineria tisulară. Structura sa conține secvențe arginină-glicină-aspartat (RGD) care favorizează adeziunea și proliferarea celulară, conferindu-i proprietăți biologice remarcabile. Hidrogelurile pe bază de gelatină au apărut ca un material popular pentru scaffold-uri în aplicații de inginerie tisulară, iar introducerea unor metode variate de reticulare a demonstrat promisiuni pentru

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

fabricarea de scaffold-uri stabile cu celule încorporate. În contextul biofabricării, gelatina a câștigat un loc central în bioprintarea 3D, utilizată pe scară largă în ingineria tisulară și medicina regenerativă pentru fabricarea de structuri tisulare și organice artificiale complexe care pot mima țesuturile naturale. Gelatina a fost utilizată ca bioink în reconstituirea unor structuri variate, de la foliculii de păr – prin tehnici de bioprintare 3D bazate pe hidrogeluri gelatin/alginat pentru a construi scaffold-uri multistrat care simulează micromediul foliculului pilos în vivo – până la modele osoase și cartilaginoase [3], [4], [5].

Gelanul (gellan gum, GG) este un polizaharid anionic de origine microbiană, produs de bacteria *Sphingomonas elodea*, aprobat de FDA ca aditiv alimentar și tot mai utilizat în domeniul biomedical. Gelanul posedă proprietăți extrem de versatile, precum ușurința de biofabricare, proprietăți mecanice reglabile, biocompatibilitate, biodegradabilitate și funcționalitate în livrarea de medicamente, ceea ce îl poziționează ca un material promițător în ingineria tisulară și medicina regenerativă. Hidrogelurile de gelan au o gamă largă de aplicații biomedicale și farmaceutice, unul dintre avantajele cheie fiind capacitatea de a controla eliberarea compușilor terapeutici, ceea ce le face ideale pentru livrarea țintită de medicamente pe diferite căi – orală, nazală și oculară. În ceea ce privește bioprintarea 3D, gelanul prezintă capacitate de gelificare la temperatura camerei, ceea ce face bioprintarea fezabilă; acesta îmbunătățește, de asemenea, proprietățile mecanice atunci când este adăugat altor materiale hidrogelice, maximizând reticularea și proprietățile de printare. Aplicațiile documentate includ regenerarea cartilajului, osului, discului intervertebral, țesutului nervos și a mușchiului scheletal. Scaffold-urile și hidrogelurile compozite pe bază de gelan au fost aplicate în ingineria tisulară a discului intervertebral și a mușchiului scheletal, în dispersia celulelor stem/progenitoare neurale, regenerarea nervilor periferici, promovarea diferențierii fibroblastelor, vindecarea plăgilor cutanate și ingineria tisulară a osului și cartilajului [6], [7], [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

În ciuda proprietăților biologice excelente, atât gelatina, cât și gelanul suferă de o limitare fundamentală comună: proprietăți mecanice insuficiente pentru numeroase aplicații clinice. Proprietățile mecanice intrinsec scăzute ale gelatinei nu sunt adecvate din punct de vedere structural și mecanic pentru a susține creșterea și proliferarea celulară. Situația este similară pentru gelatin: rezistența mecanică nedorită, stabilitatea slabă in vivo și eliberarea necontrolată a medicamentelor limitează potențialul translațional al gelatinei pentru aplicații clinice. Gelanul nu face excepție: rezistența mecanică scăzută comparativ cu țesuturile native, capacitatea redusă de inducție osoasă și suprafața relativ netedă a gelului, care înseamnă absența situsurilor de legare pentru celule, a limitat aplicarea GG ca matrice unică de bază în producerea de scaffold-uri. Mai specific, hidrogelurile de gelan reticulat fizic își pierd stabilitatea în condiții fiziologice, restricționând astfel aplicațiile acestor hidrogeluri in vivo. Problema este bine caracterizată în literatura de specialitate: proprietățile mecanice relativ slabe ale hidrogelurilor rămân un dezavantaj major pentru aplicarea lor ca scaffold-uri tisulare portante [9], [10], [11].

Pentru a depăși aceste limitări, cercetătorii au explorat mai multe strategii: reticularea dublă (dual-crosslinking), compozitele cu nanoparticule, amestecurile polimerice sau incorporarea de fibre de ranforsare. Diverse strategii de reticulare – fizică, chimică, enzimatică sau combinații ale acestora – au fost explorate pentru îmbunătățirea proprietăților mecanice ale scaffold-urilor pe bază de gelatină. Cu toate acestea, modificarea chimică prin metacrilare s-a impus ca soluție optimă, deoarece permite obținerea de hidrogeluri fotopolimerizabile cu proprietăți fin reglabile. Metacrilarea gelatinei, prin reacția grupărilor lizinei cu anhidrida metacrilică sub expunere la lumină UV, conduce la formarea gelatin-metacrilatului (GelMA), un scaffold polimeric 3D termorezistent și rigid la temperatura corpului (37 °C), cu proprietăți fizice îmbunătățite, inclusiv degradare, rigiditate și arhitectură a porilor, favorizând totodată bioactivitatea scaffold-ului, adezivitatea și răspândirea celulară. Similar, pentru îmbunătățirea rezistenței mecanice a gelurilor de gelan (GGMA), a fost incorporată metacrilarea, obținându-

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

se hidrogeluri cu proprietăți mecanice și de degradare enzimatică reglabile în funcție de gradul de metacrilare. Un avantaj decisiv al metacrilării este controlul precis al parametrilor finali: GelMA permite ajustarea proprietăților mecanice prin factori precum gradul de funcționalizare, concentrația și parametrii de fotopolimerizare – spre deosebire de alte hidrogeluri. Mai mult, gradul de metacrilare poate fi controlat în cursul sintezei, permițând personalizarea precisă a rigidității mecanice, a ratei de degradare și a interacțiunilor celulare ale hidrogelului rezultat; gradele mai ridicate de metacrilare conduc la hidrogeluri mai rigide. Astfel, metacrilarea reprezintă în prezent cea mai versatilă și documentată abordare pentru transformarea biopolimerilor naturali cu proprietăți biologice excelente dar performanțe mecanice limitate în materiale adecvate cerințelor complexe ale ingineriei tisulare moderne [12], [13], [14].

I.2.2. Materiale și metode utilizate

I.2.2.1. Materiale

Gelatina comercială din piele de pește, guma gellan comercială, anhidrida metacrilică (MA), membranele de dializă cu masa moleculară de tăiere de 14 kDa și comprimatele pentru prepararea soluției tampon fosfat salin (PBS) au fost achiziționate de la Sigma-Aldrich. Hidroxidul de sodiu (NaOH) și apa distilată au fost utilizate pentru ajustarea pH-ului și pentru etapele de purificare. Toți reactivii au fost utilizați fără purificări suplimentare.

I.2.3. Sinteza gelatinei metacrilate (GelMA)

Gelatina metacrilată (GelMA) a fost sintetizată prin funcționalizarea grupărilor amino și hidroxil ale gelatinei comerciale cu anhidridă metacrilică, în vederea obținerii unui polimer fotosensibil destinat aplicațiilor de inginerie tisulară. Procedura experimentală a fost adaptată din literatura de specialitate, cu ajustarea condițiilor de reacție în funcție de necesitățile experimentale. În prima etapă, 60 g de gelatină au fost dizolvate în 1200 mL soluție PBS într-o baie de apă menținută la 50°C, timp de aproximativ 2 ore, până la obținerea unei soluții omogene. Pe parcursul dizolvării, pH-ul a fost monitorizat și ajustat la valoarea 7,4 prin adăugarea controlată a unei soluții de NaOH 5 M. După dizolvarea completă a gelatinei, 2,235

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

mL de anhidridă metacrilică au fost adăugați treptat, prin picurare. Reacția de metacrilare s-a desfășurat sub agitație continuă timp de 3 ore, la pH controlat între 7,4 și 7,8, valoare menținută prin adăugări succesive de NaOH 5 M pentru a compensa acidificarea mediului generată de reacție.

La finalizarea procesului de metacrilare, reacția a fost oprită prin adăugarea a 300 mL PBS. Soluția obținută a fost purificată prin dializă utilizând membrane cu limita de tăiere de 14 kDa, timp de 3 zile în apă distilată, cu înlocuirea mediului la intervale de 24 de ore. Această etapă a permis îndepărtarea reactivilor nereacționați, a sărurilor și a altor compuși cu masă moleculară mică. După dializă, soluția de GelMA a fost transferată în plăcuțe Petri, congelată și ulterior liofilizată. Materialul solid rezultat a fost colectat și păstrat pentru utilizări experimentale ulterioare.

I.2.4. Sinteza gumei gelan metacrilate (GGMA)

Guma gelan metacrilată (GGMA) a fost obținută prin modificarea chimică a grupărilor hidroxil ale gumei gellan cu anhidridă metacrilică, în scopul dezvoltării unui material fotosensibil cu potențial de utilizare în ingineria tisulară și fabricația aditivă.

Pentru sinteză, 6 g de gumă gellan au fost dizolvate în 600 mL PBS la 90°C, utilizând o baie de apă și agitare continuă timp de 2 ore, până la obținerea unei soluții uniforme. În această etapă, pH-ul a fost ajustat și menținut în intervalul 8–8,5 prin adăugarea unei soluții de NaOH 5 M. Ulterior, 24 mL de anhidridă metacrilică au fost adăugați gradual în soluție. Reacția de metacrilare a fost menținută timp de 3 ore sub agitație continuă, iar pH-ul a fost monitorizat permanent și corectat cu NaOH 5 M pentru a rămâne în intervalul optim de 8–8,5. La finalul reacției, procesul a fost stopat prin adăugarea a 200 mL PBS. Soluția rezultată a fost purificată prin dializă folosind membrane de 14 kDa, timp de 3 zile în apă distilată, cu schimbarea apei la fiecare 24 de ore, pentru eliminarea reactivilor reziduali și a produselor secundare. După purificare, soluția de GGMA a fost turnată în plăcuțe Petri, congelată și ulterior liofilizată

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 obținerea produsului final sub formă solidă. Materialul rezultat a fost depozitat în vederea utilizării în experimentele ulterioare.

I.2.4. Concluzii

Gelatina metacrilată (GelMA) și guma gellan metacrilată (GGMA) au fost sintetizate cu succes prin reacții de metacrilare utilizând anhidrida metacrilică ca agent de funcționalizare. În ambele cazuri, controlul riguros al pH-ului pe durata reacției și etapa de purificare prin dializă au reprezentat factori esențiali pentru obținerea unor produse cu grad ridicat de puritate și proprietăți adecvate pentru aplicații biomedicale.

Procesele de congelare și liofilizare au permis obținerea materialelor sub formă solidă, facilitând manipularea, depozitarea și utilizarea ulterioară. Atât GelMA, cât și GGMA prezintă grupări metacrilice capabile să participe la procese de fotoreticulare, ceea ce le conferă potențial pentru fabricarea hidrogelurilor utilizate în ingineria tisulară, regenerarea țesuturilor și tehnologiile de bioimprimare 3D. Confirmarea structurală a funcționalizării poate fi realizată ulterior prin metode spectroscopice, precum FTIR și RMN.

I.2.5. Bibliografie

- [1] Segneanu AE, Bejenaru LE, Bejenaru C, Blendea A, Mogoșanu GD, Biță A, Boia ER. (2025) Advancements in Hydrogels: A Comprehensive Review of Natural and Synthetic Innovations for Biomedical Applications. *Polymers (Basel)*. doi: 10.3390/polym17152026
- [2] Revete A *et al.* (2022) Advancements in the Use of Hydrogels for Regenerative Medicine: Properties and Biomedical Applications, *International Journal of Biomaterials*, doi: 10.1155/2022/3606765
- [3] Khatun MR, Bhattacharyya A, Gunbayer M, Jung M, Noh I. (2023) Study on Bioresponsive Gelatin-Hyaluronic Acid-Genipin Hydrogel for High Cell-Density 3D Bioprinting. *Gels*. doi: 10.3390/gels9080601
- [4] Shehzad A, Mukasheva F, Moazzam M, Sultanova D, Abdikhan B, Trifonov A, Akilbekova D. (2023) Dual-Crosslinking of Gelatin-Based Hydrogels: Promising Compositions for a 3D

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

Printed Organotypic Bone Model. *Bioengineering (Basel)*. doi: 10.3390/bioengineering10060704

[5] Kang D, Liu Z, Qian C, Huang J, Zhou Y, Mao X, Qu Q, Liu B, Wang J, Hu Z, Miao Y. (2023) 3D bioprinting of a gelatin-alginate hydrogel for tissue-engineered hair follicle regeneration. *Acta Biomater*. doi: 10.1016/j.actbio.2022.03.011

[6] Muthukumar T, Song JE, Khang G. (2019) Biological Role of Gellan Gum in Improving Scaffold Drug Delivery, Cell Adhesion Properties for Tissue Engineering Applications. *Molecules*. doi: 10.3390/molecules24244514

[7] Farnaz L *et al.* (2024) Recent advances on biomedical applications of gellan gum: A review. *Carbohydrate Polymers*. doi: 10.1016/j.carbpol.2024.122008

[8] Alheib O *et al.* (2022) 3D bioprinting of gellan gum-based hydrogels tethered with laminin-derived peptides for improved cellular behavior. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. doi: 10.1002/jbm.a.37415

[9] Xu L *et al.* (2020) Preparation and characterisation of a gellan gum-based hydrogel enabling osteogenesis and inhibiting *Enterococcus faecalis*. *International Journal of Biological Macromolecules*. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.10.083

[10] Singh H *et al.* (2023) Dual cross-linked gellan gum/gelatin-based multifunctional nanocomposite hydrogel scaffold for full-thickness wound healing. *International Journal of Biological Macromolecules*. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023.126349

[11] Azmir N, Moni N, Gobetti A, Ramorino G, Dey K. (2023) Advances in Modulating Mechanical Properties of Gelatin-based Hydrogel in Tissue Engineering. *Preprints*. doi: 10.20944/preprints202310.1126.v1

[12] Velasco-Rodriguez B *et al.* (2021) Hybrid Methacrylated Gelatin and Hyaluronic Acid Hydrogel Scaffolds. Preparation and Systematic Characterization for Prospective Tissue Engineering Applications. *Int J Mol Sci*. doi: 10.3390/ijms22136758. PMID: 34201769

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

[13] Xu Z *et al.* (2018) Chemically Modified Gellan Gum Hydrogels with Tunable Properties for Use as Tissue Engineering Scaffolds. *American Chemical Society*. doi: 10.1021/acsomega.8b00683

[14] Arguchinskaya NV *et al.* (2023) Properties and Printability of the Synthesized Hydrogel Based on GelMA. *International Journal of Molecular Sciences*. doi: 10.3390/ijms24032121

Capitolul 3

I.3. Inițierea culturilor celulare pentru liniile MG63 și MC3T3-E1

Activitatea 3. Validarea in vivo a eficienței dispozitivelor REOSTEOMi

Subactivitatea 3.1. Validarea substituenților ososi în modele de șoarece

I.3.1. Introducere

Cultivarea celulară reprezintă un sistem alternativ care poate fi utilizat pentru cercetarea *in vivo*, cu o importanță semnificativă în diverse arii, precum în domeniul producției de vaccinare pe sfera medicinei anticancer. Acestea permit studiul comportamentelor celulare, a mecanismelor moleculare și a răspunsului la diverse substanțe într-un mediu controlat, fără a necesita în mod obligatoriu test pe animale sau subiecți umani. Evoluția metodelor de cultură celulară 2D și 3D permit din punct de vedere biochimic simularea mai fidelă a micromediului *in vivo*. Din perspectiva testărilor farmacologice și toxicologice, culturile celulare primare și liniile celulare continue sunt elemente indispensabile în cercetarea de bază, biomedicală și translațională, permițând evaluarea eficienței și siguranței unui compus înainte de etapele clinice [1], [2].

Un aspect fundamental în realizarea culturilor celulare este tehnica aseptică. Aceasta cuprinde toate aspectele legate de controlul mediului înconjurător, igiena personală, sterilizarea echipamentelor și mediilor de cultură, precum și procedurile de control al calității necesare pentru a garanta că procedurile sunt realizate în condiții necontaminante. Nerespectarea tehnicii aseptice poate duce la alterarea tiparelor de creștere celulară, compromiterea viabilității sau

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

chiar pierderea completă a culturii, cu consecințe directe asupra integrității și acurateței experimentului și cu risipă de resurse valoroase. Implementarea bunelor practici de cultură celulară și a tehnicilor aseptice este esențială pentru creșterea siguranței, promovarea generării de date științifice reproductibile și facilitarea comparabilității rezultatelor obținute în laboratoare diferite [3], [4].

În studiul acesta au fost folosite mai multe tipuri de linii celulare, selectate datorită relevanței lor pentru modelele experimentale studiate. Linia celulară MC3T3-E1, provenind din preosteoblaste murine, se numără printre cele mai utilizate modele *in vitro* pentru a studia diferențierea și mineralizarea osteoblastice. Aceasta este văzută ca un model clasic pentru studierea procesului de diferențiere osteogenică *in vitro*, datorită capacității semnificative de proliferare și diferențiere. Celulele MC3T3-E1 dețin aptitudinea de a se diferenția în osteoblaste mature și au fost selectate pe scară largă ca model ideal pentru investigarea diferențierii, depunerii de matrice extracelulară și mineralizării celulelor osteoblastice. Fiindcă este o linie aderentă, menținerea sa în cultură presupune o manipulare atentă pentru a păstra integritatea morfologică și potențialul de diferențiere osteogenic pe parcursul pasajelor celulare succesive [5]. A doua linie celulară utilizată, MG63, este derivată dintr-un osteosarcom uman, astfel fiind larg utilizată ca model *in vitro* cu fenotip de tip osteoblast în studiile privind metabolismul țesutului osos. Totodată, studiile de adeziune celulară au arătat faptul că celulele MG63 aderă în mod saturabil la colagenul de tip I, fibronectină și laminină, validând caracterul aderent al acestei linii și relevanța sa pentru studiul interacțiunilor dintre celulă și matrice în contextul ingineriei tisulare osoase. Prin intermediul responsivității la stimuli osteogenici și capacității proliferative ridicate, liniile celulare MG63 constituie un element valoros în screeningul de compuși cu potențial osteotrop, cu indicarea faptului că reprezintă o linie tumorală și nu reflectă în totalitate biologia osteoblastului sănătos [6].

Pentru continuarea activităților experimentale și desfășurarea etapelor următoare ale cercetării, a fost necesară deghețarea liniilor celulare crioconservate anterior MG63 și

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

MC3T3-E1 și repetarea procesului de cultivare în condiții de laborator standard. Scopul acestei etape a fost asigurarea unui număr suficient de celule viabile și proliferabile, necesare în realizarea experimentelor planificate și pentru susținerea unor stocuri adecvate de lucru. În acest sens, au fost repetate toate procedurile specifice manipulării și întreținerii de culturi celulare, incluzând dezghețarea, însămânțarea, cultivarea în medii adecvate de cultură și monitorizarea periodică a proliferării celulare. Toate procedurile au fost efectuate în conformitate cu protocoalele standard utilizate în laborator, asigurând reproducibilitatea și continuitatea procesului experimental.

I.3.2. Materiale și metode

I.3.2.1. Materiale utilizate

Liniile celulare MC3T3-E1 și MG63 au fost achiziționate de la Cytion (GmbH, Heidelberg, Germania). Celulele MC3T3-E1 au fost cultivate în mediu α -MEM suplimentat cu ribonucleozide și deoxiribonucleozide (Sigma-Aldrich Merck, Darmstadt, Germania), completat cu 10% ser fetal bovin (FBS; Gibco™, Thermo Fisher Scientific) și 1% soluție penicilină–streptomicină (P-S; Gibco™, Thermo Fisher Scientific). Celulele MG63 au fost menținute în mediul de cultură DMEM (Gibco™, Thermo Fisher Scientific), suplimentat cu 10% FBS și 1% soluție P-S. Soluțiile de tampon fosfat salin (PBS) și dimetilsulfoxid (DMSO) au fost furnizate de Sigma-Aldrich Merck (Darmstadt, Germania), iar tripsina a fost achiziționată de la Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, SUA).

I.3.2.2. Dezghețarea și inițierea liniilor celulare

I.3.2.2.1. Dezghețarea liniei celulare MC3T3-E1

Pentru început, linia celulară MC3T3-E1 a fost introdusă în cultură utilizând mediul adecvat, α -MEM suplimentat cu ribonucleozide și deoxiribonucleozide, 10% FBS și 1% P-S. Criotubul conținând suspensia celulară a fost dezghețat rapid utilizând o baie cu bile metalice

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

menținută la 37°C, apoi dezinfectat la exterior cu etanol 70% și transferat în hota cu flux laminar pentru manipulare în condiții sterile.

Conținutul criotubului a fost omogenizat prin pipetare delicată și transferat într-un tub conic de 15 mL în care s-au adăugat în prealabil 8 mL de mediu complet, cu scopul diluării și îndepărtării agentului crioprotector. Suspensia celulară a fost centrifugată la 1000 de rotații pe minut (rpm) timp de 3 minute, după care supernatantul a fost eliminat, iar peletul celular rezultat a fost resuspendat în 1 mL de mediu complet proaspăt.

Ulterior, celulele provenite din criotub au fost distribuite într-un flask T75 destinat culturilor celulare aderente conținând 10 mL mediu complet proaspăt și incubate în condiții standard de cultură (37°C, 5% CO₂). Această etapă a avut ca scop favorizarea aderării celulare la suprafața vasului de cultură și stimularea proliferării celulelor pentru utilizarea lor în experimentele ulterioare.

I.3.2.2.2. Dezghețarea liniei celulare MG63

Mai departe, linia celulară MG63 a fost readusă în cultură utilizând mediu DMEM suplimentat cu 10% FBS și 1% P-S. Criotubul care conținea celulele crioconservate a fost dezghețat rapid la 37°C într-o baie cu bile metalice, apoi a sterilizat extern cu etanol 70% și transferat în hota cu flux laminar pentru continuarea manipulărilor în condiții aseptice.

Suspensia celulară a fost transferată într-un tub conic de 15 mL ce conținea 8 mL de mediu complet adăugat în prealabil, pentru reducerea concentrației agentului crioprotector. După omogenizare, proba a fost centrifugată la 1000 rpm timp de 3 minute. Supernatantul a fost îndepărtat cu atenție, iar peletul celular obținut a fost resuspendat în 1 mL de mediu DMEM complet.

Celulele au fost ulterior însămânțate în 1 flask T75 destinat culturilor celulare aderente și incubate în condiții standard de cultură celulară (37°C, 5% CO₂). Cultura a fost verificată periodic pentru evaluarea aderării și proliferării celulare utilizând un microscop optic,

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

urmărindu-se obținerea unei densități celulare adecvate pentru desfășurarea etapelor experimentale următoare.

I.3.2.3. Pasajele celulare

I.3.2.3.1. Pasaj celular pentru linia MC3T3-E1

Subcultivarea liniei celulare MC3T3-E1 a fost realizată în condiții aseptice, utilizând mediu α -MEM complet suplimentat și respectând protocoalele standard de cultură celulară. Toate manipulările au fost efectuate în hotă cu flux laminar pentru menținerea sterilității și protecția utilizatorului, iar culturile au fost incubate la 37°C, într-o atmosferă umidificată cu 5% CO₂, condiții standard necesare pentru susținerea creșterii și metabolismului celular.

La atingerea unui grad de confluență adecvat, mediul de cultură a fost îndepărtat, iar celulele au fost spălate cu soluție PBS pentru eliminarea urmelor reziduale din mediul vechi și a produselor metabolice acumulate. Detașarea celulelor aderente a fost realizată prin tratarea cu soluție de tripsină, urmată de o perioadă scurtă de incubare (aproximativ 3 minute) la 37°C până la desprinderea completă a monostratului celular. Activitatea enzimei a fost ulterior oprită prin adăugarea de mediu complet proaspăt, iar suspensia celulară rezultată a fost omogenizată prin pipetare delicată pentru a asigura o distribuție uniformă a celulelor.

Mai departe, celulele au fost repartizate în noi recipiente de cultură care conțineau 10 mL mediu proaspăt și au fost reintroduse în incubator pentru a permite aderarea și proliferarea acestora în continuare. Pentru menținerea unor condiții potrivite de creștere, mediul de cultură a fost înlocuit periodic, la intervale de 2–3 zile. Procesul de subcultivare a fost repetat succesiv, pe măsura atingerii confluenței.

I.3.2.3.2. Pasaj celular pentru linia MG63

Subcultivarea liniei celulare MG63 a fost realizată tot în condiții aseptice, utilizând mediu DMEM complet suplimentat conform relatării anterioare. Toate etapele procedurii au fost efectuate în hotă cu flux laminar pentru a preveni contaminarea culturilor și protecția

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

utilizatorului, iar celulele au fost menținute în incubator la temperatura fiziologică de 37°C, într-o atmosferă umidificată cu 5% CO₂, condiții optime pentru creșterea și proliferarea acestora.

După atingerea confluenței celulare dorite, mediul de cultură a fost îndepărtat, iar monostratul celular a fost spălat cu soluție PBS pentru eliminarea reziduurilor de mediu și a componente metabolice. Ulterior, s-a adăugat soluția de tripsină, iar culturile au fost incubate pentru o perioadă scurtă (aproximativ 3 minute) la 37°C, până la detașarea completă a celulelor de pe suprafața flask-ului. Acțiunea enzimatică a fost neutralizată prin adăugarea de mediu complet proaspăt, iar suspensia celulară a fost omogenizată prin pipetare ușoară pentru a obține o distribuție uniformă a celulelor.

Celulele au fost mai departe redistribuite în recipiente noi de cultură T75, conținând mediu DMEM proaspăt 10 mL, și incubate în condiții standard precizate anterior pentru a permite readerarea și multiplicarea lor. Mediul de cultură a fost schimbat în mod regulat, la intervale de 2–3 zile, pentru asigurarea unui aport constant de nutrienți și pentru eliminarea metaboliților rezultați în urma activității celulare. Procedura de pasaj a fost repetată ori de câte ori culturile au atins confluența optimă.

I.3.3. Concluzii

În cadrul acestor protocoale au fost realizate cu succes procedurile de dezghețare și subcultivare în pasaje celulare a liniilor MC3T3-E1 și MG63, utilizate în mod frecvent ca modele *in vitro* pentru studiul proceselor implicate în regenerarea țesutului osos. Însușirea protocoalelor standard de cultură celulară a condus la obținerea unor culturi stabile, caracterizate de viabilitate ridicată și o capacitate adecvată de proliferare.

Utilizarea mediilor de cultură adecvate fiecărei linii celulare și menținerea condițiilor optime de păstrare au contribuit la dezvoltarea și extinderea eficientă a culturilor, ajungând la un număr suficient de celule pentru desfășurarea experimentelor ulterioare. Monitorizarea

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

constantă a morfologiei și a gradului de confluență a evidențiat adaptarea corespunzătoare a celulelor la condițiile de cultură și menținerea proprietăților caracteristice fiecărei linii.

Procedurile repetate de pasaje au permis multiplicarea controlată a celulelor și obținerea unui stoc adecvat de culturi pentru experimentele planificate. Respectarea condițiilor aseptice pe întreaga durată a activităților experimentale a contribuit la prevenirea contaminărilor, protecția utilizatorului și la asigurarea reproductibilității rezultatelor.

În concluzie, activitățile desfășurate au permis pregătirea cu succes a liniilor celulare MC3T3-E1 și MG63 pentru utilizarea lor în evaluarea biologică a biomaterialelor destinate regenerării osoase, constituind o etapă esențială pentru continuarea cercetărilor și pentru obținerea unor rezultate relevante din punct de vedere biomedical.

I.3.4. Bibliografie

- [1] Zhao, C. (2023). Cell culture: *in vitro* model system and a promising path to *in vivo* applications. *Journal of Histotechnology*, 46(1), 1–4. doi: 10.1080/01478885.2023.2170772
- [2] Kitaeva KV, Rutland CS, Rizvanov AA and Solovyeva VV (2020). Cell Culture Based *in vitro* Test Systems for Anticancer Drug Screening. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 8:322. doi: 10.3389/fbioe.2020.00322
- [3] Coté RJ. Aseptic technique for cell culture (2021). *Curr Protoc Cell Biol.* May; Chapter 1:Unit 1.3. doi: 10.1002/0471143030.cb0103s00
- [4] Weiskirchen S, Schröder SK, Buhl EM, Weiskirchen R (2023). A Beginner's Guide to Cell Culture: Practical Advice for Preventing Needless Problems. *Cells*. 12(5):682. doi: 10.3390/cells12050682
- [5] Ju W, Zhang G, Zhang X, Wang J, Wu T, Li H (2022). Involvement of MiRNA-211-5p and Arhgap11a Interaction During Osteogenic Differentiation of MC3T3-E1 Cells. *Front Surg.* 9:857170. doi: 10.3389/fsurg.2022.857170
- [6] Clover J, Gowen M (1994). Are MG-63 and HOS TE85 human osteosarcoma cell lines representative models of the osteoblastic phenotype? *Bone*. (6):585-91. doi: 10.1016/8756-3282(94)90305-0

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

PARTEA a II-a

Capitolul 1

II.1. Pregătirea culturii celulare și evaluarea biocompatibilității structurilor din GelMA, GellanMA și diferite concentrații de GO, prin microscopie confocală cu marcarea Live/Dead

Activitatea 3. Validarea *in vivo* a eficienței dispozitivelor REOSTEOMi

Subactivitatea 3.3. Investigarea *in vivo* a inducerii formării de țesut osos în șoareci osteoporotici de către factorii terapeutici rezultați din Activitățile 1 și 2.

II.1.1. Introducere

În domeniul ingineriei tisulare și al dezvoltării biomaterialelor, interacțiunile dintre celule și materialele suport joacă un rol esențial în determinarea performanței biologice și a succesului aplicațiilor regenerative. Comportamentul celular este influențat nu doar de viabilitatea mediului de cultură, ci și de caracteristicile fizico-chimice ale biomaterialului, inclusiv compoziția chimică, proprietățile mecanice, topografia suprafeței și arhitectura tridimensională. Aceste caracteristici pot modula procese fundamentale precum adeziunea, proliferarea, migrarea și organizarea celulară, influențând implicit integrarea și funcționalitatea constructelor destinate regenerării tisulare [1], [2].

În acest context, evaluarea răspunsului celular reprezintă o etapă critică în caracterizarea biomaterialelor. Dincolo de determinarea viabilității, tehnicile moderne de analiză permit investigarea morfologiei celulare, a distribuției spațiale a celulelor și 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

interacțiunilor acestora cu matricea suport [3], [4]. Metodele bazate pe microscopie de fluorescență, în special microscopia confocală cu achiziție de imagini în secțiuni optice succesive (Z-stack), oferă posibilitatea reconstrucției tridimensionale a structurilor analizate și permit evaluarea detaliată a colonizării scaffold-urilor, a gradului de infiltrare celulară și a organizării celulelor în profunzimea materialului. Astfel, aceste tehnici furnizează informații relevante privind biocompatibilitatea și capacitatea biomaterialelor de a susține dezvoltarea celulară într-un mediu tridimensional, depășind limitările evaluărilor bazate exclusiv pe cuantificarea celulelor viabile [5], [6].

În cadrul prezentului studiu, au fost investigate scaffold-uri destinate pentru a oferi un mediu 3D favorabil dezvoltării celulare, urmărindu-se influența compoziției asupra comportamentului celular. Analiza a fost realizată pe probe pe bază de gelatină metacrilată (GelMA), gumă gellan metacrilată (GellanMA) și diferite concentrații de oxid de grafenă (GO), evaluate la 7 și 14 zile prin marcarea Live/Dead și vizualizate prin microscopie confocală.

II.1.2. Matertiale și metode

II.1.2.1. Materiale

Pentru toate experimentele a fost utilizată linia celulară umană MG-63 (CLS Cell Lines Service GmbH, Heidelberg, Germania). Celulele au fost cultivate în mediu Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SUA), suplimentat cu 10% ser fetal bovin (FBS; Gibco™, Thermo Fisher Scientific) și 1% soluție Penicilină–Streptomicină (100×; Gibco™, Thermo Fisher Scientific). Viabilitatea celulară au fost evaluate utilizând kitul comercial Live/Dead Viability/Cytotoxicity Kit for Mammalian Cells (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SUA). Soluția tampon fosfat salin (PBS) a fost achiziționată de la Sigma-Aldrich, Merck (Darmstadt, Germania), iar tripsina utilizată pentru detașarea celulară a fost furnizată de Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, SUA).

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

II.1.2.2. Însămânțarea celulelor și pregătirea probelor

Pentru evaluarea interacțiunilor dintre celule și biomaterial, au fost selectate câte patru probe pentru fiecare tip de scaffold, acestea fiind plasate individual în plăci Petri sterile. Înainte de însămânțare, linia celulară MG-63 a fost menținută în cultură prin pasaje celulare regulate, realizate la atingerea unui grad optim de confluență, în vederea păstrării viabilității, a capacității proliferative și a caracteristicilor fenotipice specifice. Pentru asigurarea condițiilor aseptice, probele au fost sterilizate sub hotă cu flux laminar vertical prin expunere la radiații UV timp de 1 h pentru fiecare față a scaffold-ului, cu scopul eliminării potențialelor contaminări microbiologice. Pregătirea suspensiei celulare a fost realizată prin detașarea celulelor aderente utilizând tripsină. După îndepărtarea mediului de cultură, suprafața flask-urilor a fost spălată de două ori cu câte 5 mL PBS pentru eliminarea urmelor de ser care ar putea inhiba activitatea enzimei. Ulterior, au fost adăugați 2 mL de soluție de tripsină, iar celulele au fost incubate timp de aproximativ 3 minute pentru facilitarea detașării de substratul de cultură. După desprindere, tripsina a fost neutralizată prin adăugarea a 6 mL de mediu complet, omogenizate ușor și transferate într-un tub conic de 15 mL. Suspensia celulară a fost centrifugată la 1300 rpm timp de 3 minute, iar supernatantul rezultat a fost îndepărtat.

Peletul celular obținut a fost resuspendat în 1 mL de mediu complet, iar densitatea celulară și viabilitatea au fost determinate cu albastru tripan. Suspensia celulară a fost ulterior ajustată la concentrația dorită, iar pe fiecare scaffold au fost însămânțate 100 000 celule. După însămânțare, probele au fost incubate în condiții standard de cultură celulară, în prezența a 2 mL de mediu complet per probă, pentru a asigura contactul optim dintre celule și biomaterial. Evaluarea viabilității celulare și a comportamentului celular pe scaffold-uri a fost realizată după 7 și 14 zile de cultură.

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

II.1.2.3. Evaluarea viabilității celulare prin microscopie confocală și marcare Live/Dead

Viabilitatea celulară pe suprafața și în interiorul scaffold-urilor a fost evaluată utilizând testul Live/Dead, o metodă bazată pe coloranți fluorescenți care permit diferențierea celulelor viabile de cele neviabile prin marcarea selectivă a acestora. Analizele au fost efectuate după 7 și 14 zile de cultură celulară, pentru a monitoriza evoluția răspunsului biologic în timp și capacitatea scaffold-urilor de a susține supraviețuirea și dezvoltarea celulară pe termen mediu. În vederea realizării testului, soluția PBS a fost adusă la temperatura de 37°C, iar reactivii kitului Live/Dead, respectiv Calcein AM și Ethidium Homodimer-1, au fost încălziți la temperatura camerei înainte de utilizare. Întreaga procedură experimentală a fost efectuată în condiții de protecție față de lumină, pentru a preveni degradarea fotochimică a coloranților fluorescenți.

Soluția de lucru a fost preparată prin adăugarea a 5 μL Calcein AM și 20 μL Ethidium Homodimer-1 în 10 mL PBS steril. După îndepărtarea mediului de cultură, probele au fost spălate de două ori cu PBS pentru eliminarea reziduurilor de mediu și a componentelor care ar putea interfera cu procesul de colorare. Ulterior, fiecare probă a fost incubată cu soluția Live/Dead timp de 50 de minute, în absența luminii, pentru a permite pătrunderea și distribuția uniformă a coloranților la nivel celular.

După finalizarea incubării, soluția de colorare a fost îndepărtată, iar probele au fost spălate ușor și menținute în PBS pentru etapa de imagistică. Evaluarea viabilității și distribuției celulare a fost realizată utilizând un microscop confocal Zeiss LSM 880 (Zeiss, Oberkochen, Germany). Pentru fiecare probă au fost achiziționate serii de secțiuni Z-stack, care au permis reconstrucția tridimensională a scaffold-urilor și analiza distribuției spațiale a celulelor în profunzimea structurii. Această abordare a furnizat informații atât privind proporția celulelor viabile și neviabile, cât și asupra gradului de colonizare celulară, infiltrării în structura poroasă și interacțiunilor celulă-biomaterial, oferind o evaluare complexă a biocompatibilității materialelor investigate.

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

II.1.3. Rezultate și discuții

Analiza prin microscopie confocală cu reconstrucție 3D Z-stack a permis evaluarea distribuției, viabilității și organizării celulare pe scaffold-urile investigate pe bază de GelMA/GellanMA cu diferite concentrații de GO. Imaginile obținute evidențiază diferențe semnificative între formulările testate, atât în ceea ce privește densitatea celulară, cât și gradul de colonizare și infiltrare în structura poroasă a materialelor. La 7 zile de cultură (Figura 1), toate grupurile experimentale au prezentat prezența celulelor viabile (marcate verde), confirmând biocompatibilitatea generală a scaffold-urilor. Totuși, se observă variații importante în ceea ce privește distribuția celulară.

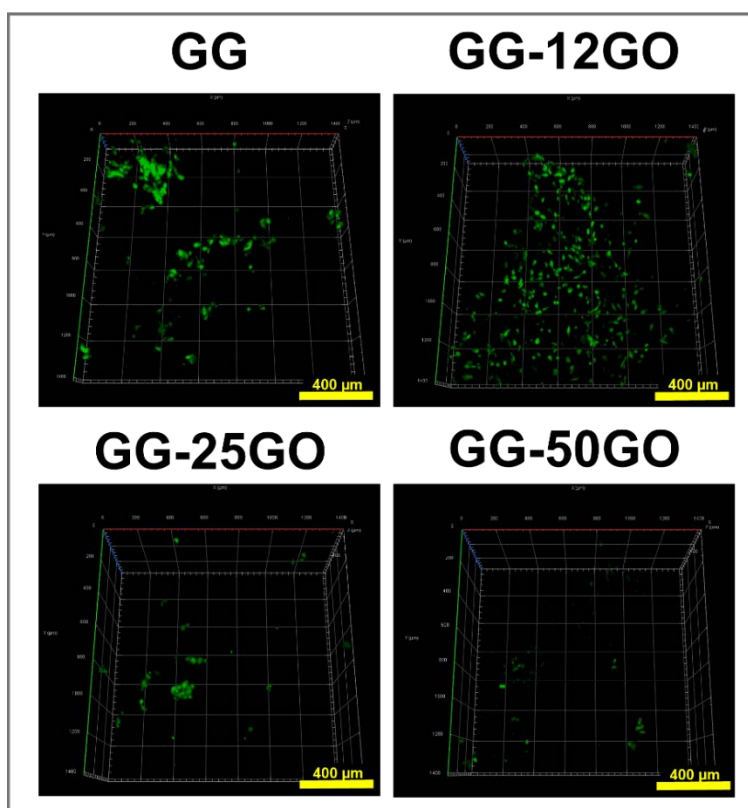


Figura 1. Imagini de microscopie confocală a celulelor MG-63 după 7 zile de contact cu scaffold-urile cu diferite concentrații de GO (scală de 400 μm).

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

Probele control și cele cu concentrații mai ridicate de GO prezintă o densitate celulară relativ scăzută și o distribuție neuniformă, cu celule localizate predominant la suprafața materialului și în zone izolate. În contrast, scaffold-urile din grupul GG-12GO prezintă o creștere semnificativă a numărului de celule aderente, cu o distribuție mai uniformă în volumul materialului. Celulele sunt mai bine organizate spațial, cu tendință de agregare și extindere citoplasmatică, sugerând o interacțiune celulă-biomaterial îmbunătățită și o adeziune superioară comparativ cu celelalte grupuri. Aceste rezultate indică faptul că o concentrație optimizată de GO poate favoriza microambientul celular și poate susține proliferarea inițială.

La 14 zile de cultură (Figura 2), se evidențiază amplificarea diferențelor observate anterior între grupurile experimentale, ceea ce sugerează că efectele inițiale ale compoziției scaffold-ului asupra comportamentului celular devin mai pronunțate odată cu prelungirea timpului de cultură. În timp ce probele control și cele cu concentrații mai scăzute de GO prezintă o creștere moderată a densității celulare, această proliferare pare să fie însoțită de o organizare spațială mai puțin eficientă, distribuția rămânând relativ heterogenă, cu zone slab populate și infiltrare limitată în profunzimea scaffold-ului. Acest lucru poate indica o capacitate redusă de migrare celulară în interiorul matricei sau o interacțiune mai slabă celulă-material, ceea ce limitează colonizarea tridimensională completă. În schimb, grupul GG-12GO prezintă o colonizare celulară evident superioară, caracterizată printr-o densitate semnificativ mai mare a celulelor viabile și o distribuție tridimensională mult mai uniformă în întreaga structură a scaffold-ului. Această comportare sugerează nu doar o proliferare mai activă, ci și o îmbunătățire a capacității celulelor de a migra și de a se ancora eficient în microstructura materialului. Imaginile Z-stack evidențiază o infiltrare celulară mai profundă, inclusiv în regiunile centrale ale scaffold-ului, ceea ce indică o permeabilitate celulară crescută și o integrare mai eficientă în arhitectura poroasă a biomaterialului. Totodată, se observă o conectivitate intercelulară mai bine definită, cu tendințe de organizare în rețele mai coerente, sugerând nu doar o simplă proliferare, ci și o etapă incipientă de organizare tisulară. Acest

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

aspect este important deoarece indică o comunicare celulară mai eficientă și o posibilă intensificare a interacțiunilor mediate de matrice extracelulară. În ansamblu, aceste observații sugerează o maturizare progresivă a rețelei celulare și o interacțiune stabilă și benefică cu matricea biomaterialului, ceea ce poate contribui la menținerea viabilității pe termen lung și la susținerea unor procese regenerative mai eficiente.

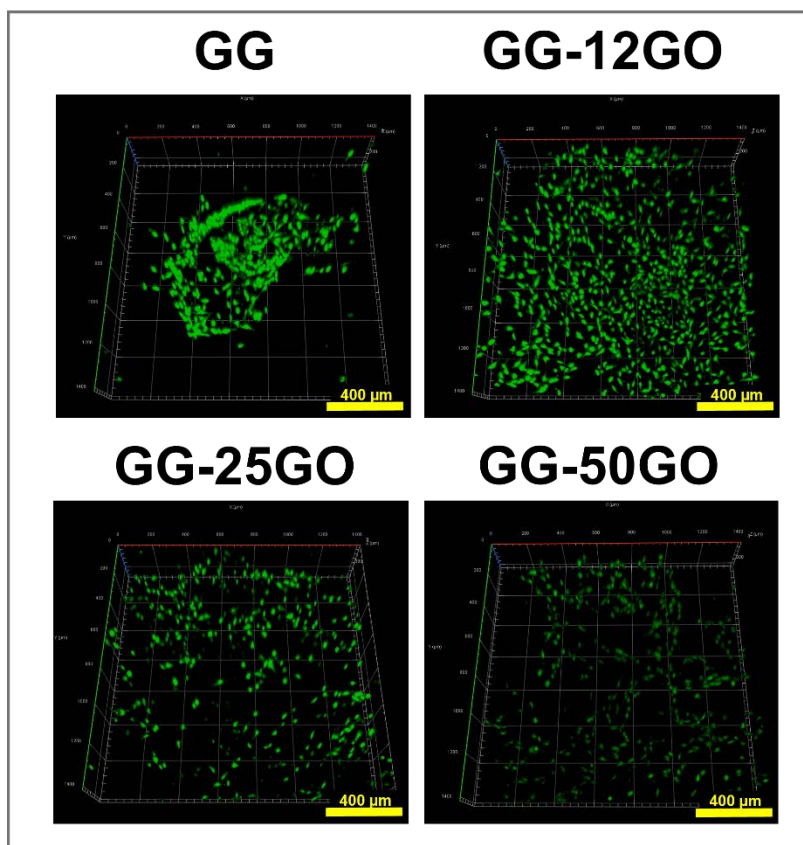


Figura 2. Imagini de microscopie confocală a celulelor MG-63 după 14 zile de contact cu scaffold-urile cu diferite concentrații de GO (scală de 400 μm).

II.1.4. Concluzii

În ansamblu, rezultatele obținute prin microscopie confocală cu reconstrucție 3D Z-stack oferă o imagine clară asupra influenței concentrației de GO asupra comportamentului

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

celular în cadrul scaffold-urilor pe bază de GelMA/GellanMA, evidențiind rolul critic al optimizării compoziției materialului în ingineria tisulară. Analiza comparativă a celor două intervale de timp (7 și 14 zile) demonstrează că diferențele dintre grupurile experimentale nu sunt doar cantitative, ci și calitative, acestea accentuându-se odată cu prelungirea timpului de expunere celulară la biomaterial. La 7 zile, probele control și cele cu concentrații mai ridicate de GO prezintă o colonizare limitată, cu celule distribuite predominant superficial și o capacitate redusă de infiltrare în profunzimea structurii poroase. Această distribuție sugerează o adeziune inițială acceptabilă, dar o interacțiune insuficient optimizată pentru susținerea unei colonizări tridimensionale eficiente. În contrast, grupul GG-12GO evidențiază o adeziune celulară mai intensă, o distribuție mai uniformă și semne timpurii de organizare celulară, indicând faptul că această formulare creează un microambient mai favorabil pentru atașare și extindere celulară.

La 14 zile, diferențele devin mult mai evidente, ceea ce indică faptul că efectele proprietăților materialului asupra comportamentului celular se amplifică în timp. În grupurile control și cu concentrații mai scăzute de GO, deși se observă o creștere a densității celulare, aceasta nu este însoțită de o îmbunătățire semnificativă a organizării spațiale sau a capacității de infiltrare. Persistența unei distribuții heterogene și a unor zone slab populate sugerează limitări în difuzia celulară și în interacțiunea eficientă cu matricea, ceea ce poate conduce la o colonizare incompletă a scaffold-ului și, implicit, la o potențială eficiență redusă în aplicații regenerative. În schimb, scaffold-urile din grupul GG-12GO demonstrează o performanță superioară atât în termeni de proliferare, cât și de organizare tridimensională. Densitatea celulară ridicată, distribuția uniformă și infiltrarea profundă evidențiate prin imaginile Z-stack indică o integrare eficientă a celulelor în structura materialului. Mai mult, prezența unei conectivități intercelulare mai bine definite sugerează nu doar o creștere numerică a populației celulare, ci și o evoluție către o rețea celulară funcțională, cu potențial de comunicare intercelulară îmbunătățită și organizare similară unei arhitecturi tisulare incipiente. Acest

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

aspect este deosebit de relevant, deoarece sugerează că materialul nu doar susține supraviețuirea celulară, ci și promovează procesele de organizare și maturizare celulară.

În concluzie, rezultatele indică faptul că incorporarea optimizată a GO în matricea GelMA/GellanMA poate avea un impact semnificativ asupra comportamentului celular, influențând atât proliferarea, cât și organizarea spațială și capacitatea de infiltrare în scaffold. Formularea GG-12GO se evidențiază ca fiind cea mai performantă dintre cele testate, oferind un microambiant biomaterial favorabil pentru colonizare tridimensională extinsă și pentru dezvoltarea unei rețele celulare coerente. Aceste observații susțin potențialul acestei compoziții în aplicații de inginerie tisulară și medicină regenerativă, unde sunt necesare materiale capabile nu doar să susțină viabilitatea celulară, ci și să promoveze organizarea funcțională a țesuturilor pe termen lung.

II.1.5. Bibliografie

- [1] M. Mateu-Sanz *et al.*, “Redefining biomaterial biocompatibility: challenges for artificial intelligence and text mining,” *Trends Biotechnol.*, vol. 42, no. 4, pp. 402–417, Apr. 2024, doi: 10.1016/j.tibtech.2023.09.015.
- [2] P. Apelgren *et al.*, “Biomaterial and biocompatibility evaluation of tunicate nanocellulose for tissue engineering,” *Biomaterials Advances*, vol. 137, p. 212828, Jun. 2022, doi: 10.1016/J.BIOADV.2022.212828.
- [3] A. B. Karakullukcu, E. Taban, and O. O. Ojo, “Biocompatibility of biomaterials and test methods: A review,” *Materialprüfung/Materials Testing*, vol. 65, no. 4, pp. 545–559, Apr. 2023, doi: 10.1515/MT-2022-0195/XML.
- [4] M. E. Harley-Troxell, R. Steiner, R. C. Advincula, D. E. Anderson, and M. Dhar, “Interactions of Cells and Biomaterials for Nerve Tissue Engineering: Polymers and Fabrication,” *Polymers* 2023, Vol. 15, vol. 15, no. 18, Sep. 2023, doi: 10.3390/POLYM15183685.
- [5] P. Mhaske, S. Kasapis, A. Farahnaky, and M. Dokouhaki, “Quantifying Phase Behaviour in Model Food Composites Using 3D Confocal Laser Scanning Microscopy,” *Food Biophysics* 2022 17:2, vol. 17, no. 2, pp. 165–170, Jan. 2022, doi: 10.1007/S11483-021-09713-8.
- [6] I. S. Martinez, A. M. S. Lee, and K. A. B. Llamson, “Development of a second harmonic generation microscope optimized for biomaterial studies,” *Pure and Applied Chemistry*, vol. 97, no. 5, pp. 569–576, May 2025, doi: 10.1515/PAC-2024-0383/XML.

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

II.2. Captiolul 2

II.2. Teste de biocompatibilitate (MTT și LDH) pe probele printate 3D cu formulări pe bază de k-caragenan, alginat și 0-1%, aflate în contact direct cu celule MC3T3-E1.

Activitatea 3. Validarea *in vivo* a eficienței dispozitivelor REOSTEOMi

Subactivitatea 3.1. Investigarea *in vivo* a inducerii formării de țesut osos în șoareci osteoporotici de către factorii terapeutici rezultați din Activitățile 1 și 2

II.2.1. Introducere

În cadrul proiectului REOSTEOMi, evaluarea biocompatibilității suporturilor funcționale printate 3D reprezintă o etapă esențială pentru stabilirea potențialului acestora de utilizare în aplicații biomedicale, în special în domeniul regenerării osoase. În acest context, au fost analizate probe printate 3D obținute din formulări pe bază de alginat, κ-caragenan și spirulină, cu concentrații de spirulină cuprinse între 0 și 1%. Aceste componente au fost selectate datorită caracterului lor biocompatibil, a capacității de formare a unor hidrogeluri stabile și a potențialului bioactiv asociat spirulinei [1]. Studiile de biocompatibilitate au fost realizate prin contact direct între probele printate 3D și celulele MC3T3-E1, o linie celulară preosteoblastică utilizată frecvent pentru evaluarea răspunsului celular în raport cu biomaterialele destinate aplicațiilor osoase. Alegerea acestei linii celulare permite investigarea modului în care suporturile obținute influențează activitatea metabolică și integritatea celulară în condiții *in vitro* [2]. Pentru caracterizarea răspunsului biologic au fost utilizate două teste complementare, MTT și LDH [3]. Testul MTT a fost folosit pentru evaluarea activității metabolice celulare, ca indicator indirect al viabilității celulelor MC3T3-E1 după expunerea la probele printate 3D. Testul LDH a fost utilizat pentru aprecierea citotoxicității, prin cuantificarea lactat-dehidrogenazei eliberate în mediul de cultură ca urmare a afectării membranei celulare. Prin corelarea celor două teste, se poate obține o imagine mai completă asupra comportamentului biologic al formulărilor investigate [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

Probele analizate au inclus formulări cu rapoarte diferite între alginat și κ -caragenan, respectiv 1:1 și 2:1, precum și concentrații variabile de spirulină, de 0%, 0,5% și 1%. Evaluările au fost realizate după 1, 2 și 5 zile de incubare, pentru a observa atât răspunsul celular inițial, cât și evoluția acestuia în timp. Această abordare permite identificarea formulării cu cel mai favorabil profil de biocompatibilitate, prin raportarea simultană la menținerea activității metabolice și la absența unui efect citotoxic relevant. Prin urmare, testele MTT și LDH au avut ca scop determinarea compatibilității celulare a suporturilor funcționale printate 3D pe bază de alginat, κ -caragenan și spirulină, precum și selectarea compoziției optime pentru etapele ulterioare de dezvoltare și validare în cadrul proiectului REOSTEOMi.

II.2.2. Materiale și metode

Linia celulară MC3T3-E1 au fost achiziționate de la Cytion (GmbH, Heidelberg, Germania). Celulele MC3T3-E1 au fost cultivate în mediu α -MEM suplimentat cu ribonucleozide și deoxiribonucleozide (Sigma-Aldrich Merck, Darmstadt, Germania), completat cu 10% ser fetal bovin (FBS; Gibco™, Thermo Fisher Scientific) și 1% soluție penicilină–streptomycină (P-S; Gibco™, Thermo Fisher Scientific). Soluțiile de tampon fosfat salin (PBS) și dimetilsulfoxid (DMSO) au fost furnizate de Sigma-Aldrich Merck (Darmstadt, Germania), iar tripsina a fost achiziționată de la Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, SUA). Testul colorimetric cu săruri de tetrazoliu MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid, soluția fosfat salin (PBS), dimetilsulfoxidul (DMSO), testul de colorare cu Alizarin Red S, acidul acetic, amoniacul și Triton™ X-100 au fost toate furnizate de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Kitul comercial CyQUANT™ LDH Cytotoxicity Assay a fost achiziționat de la Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, SUA).

II.2.2.1. Dezghețarea și pasaj pentru linia celulară MC3T3-E1

Linia celulară MC3T3-E1 a fost introdusă în cultură în mediu α -MEM complet, suplimentat cu ribonucleozide, deoxiribonucleozide, 10% FBS și 1% P-S. Criotubul a fost

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

dezghețat rapid la 37°C, dezinfectat cu etanol 70% și manipulat în hotă cu flux laminar. Suspensia celulară a fost diluată în mediu complet pentru îndepărtarea agentului crioprotector, centrifugată la 1000 rpm timp de 3 minute, iar peletul obținut a fost resuspendat în mediu proaspăt.

Celulele au fost apoi transferate într-un flask T75 cu 10 mL mediu complet și incubate la 37°C, în atmosferă umidificată cu 5% CO₂, pentru favorizarea aderării și proliferării. La atingerea confluentei adecvate, mediul a fost îndepărtat, celulele au fost spălate cu PBS și detașate prin tratare cu tripsină timp de aproximativ 3 minute. Reacția enzimatică a fost oprită prin adăugarea de mediu complet, iar suspensia celulară a fost omogenizată și redistribuită în noi recipiente de cultură. Mediul a fost schimbat periodic la 2–3 zile, iar subcultivarea a fost repetată în funcție de gradul de confluință al culturilor.

II.2.2.2 Expunerea culturii celulare la structurile analizate

Liniile celulare MC3T3-E1 au fost cultivate în mediu α -MEM complet, suplimentat cu ribonucleozide, deoxiribonucleozide, 10% FBS și 1% Penicilină-Streptomicină, în condiții standard de cultură, la 37°C, 5% CO₂ și 90% umiditate relativă. Celulele au fost însămânțate la o densitate de 100.000 celule/500 μ L/godeu într-o placă cu 24 de godeuri și incubate timp de 24 h pentru a permite aderarea la substrat.

Probele pe bază de alginat, κ -caragenan și spirulină au fost sterilizate anterior prin expunere la radiații gamma, pentru eliminarea contaminării microbiene înainte de utilizare. Compozițiile evaluate au fost preluate din formulările descrise în brevet și au inclus probe fără spirulină și probe cu spirulină în concentrații de 0,5% și 1,0% (m/v), pe două rapoarte alginat/ κ -caragenan: AK11, corespunzător raportului 1:1, și AK21, corespunzător raportului 2:1. Astfel, au fost analizate formulările AK11, AK11-0.5, AK11-1.0, AK21, AK21-0.5 și AK21-1.0. În cazul formulării optime AK21-0.5, compoziția a fost reprezentată de alginat și κ -caragenan în raport 2:1, cu 0,5% (m/v) spirulină, conform descrierii din brevet.

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

După sterilizare, probele au fost plasate în contact direct cu celulele MC3T3-E1 și incubate timp de 1, 2 și 5 zile. Pentru asigurarea imersării complete a probelor și menținerea condițiilor adecvate de cultură, în fiecare godeu s-au adăugat suplimentar 2 mL de mediu complet. Incubarea s-a realizat la 37°C, în atmosferă umidificată cu 5% CO₂ și 90% umiditate relativă. La finalul fiecărui interval experimental, răspunsul celular a fost evaluat prin teste specifice de viabilitate și citotoxicitate. Viabilitatea celulelor MC3T3-E1 a fost determinată prin testul MTT, iar citotoxicitatea a fost analizată prin cuantificarea eliberării lactat-dehidrogenazei (LDH). De asemenea, a fost evaluat gradul de mineralizare al culturilor celulare după expunerea la probe, pentru aprecierea diferențierii osteoblastice. Controlul negativ a fost reprezentat de celule MC3T3-E1 cultivate doar în mediu complet, iar controlul pozitiv a fost reprezentat de celule expuse la Triton X-100 1% în mediu complet. Datele au fost exprimate ca medie ± deviație standard, iar analiza statistică a fost realizată prin testul Student t-test, cu praguri de semnificație stabilite la *p<0,05, **p<0,01 și ***p<0,001.

II.2.2.3 Expunerea culturii celulare la structurile analizate

Evaluarea viabilității celulare a fost realizată prin intermediul testului colorimetric bazat pe săruri de tetrazoliu MTT. După finalizarea perioadei de incubare, mediul de cultură a fost îndepărtat, iar celulele au fost expuse unei soluții de MTT preparate prin diluarea a 10% soluție stoc (5 mg/mL MTT în PBS) în mediu de cultură DMEM complet. Probele au fost incubate timp de 2 ore în condiții standard (37°C, 5% CO₂), pentru a permite metabolizarea MTT de către enzimele mitocondriale active din celulele viabile, proces care conduce la formarea de cristale de formazan insolubile în apă.

După încheierea incubării, soluția de MTT a fost îndepărtată, iar cristalele formate au fost dizolvate prin adăugarea de DMSO, pentru a permite cuantificarea. Concentrația de formazan, direct proporțională cu numărul celulelor viabile, a fost determinată prin măsurarea absorbției la o lungime de undă de 570 nm utilizând un spectrofotometru. Valoarea absorbției

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

obținute pentru fiecare probă a fost raportată la cea a controlului negativ, considerat referință (100%), pentru a calcula procentual viabilitatea celulară relativă.

II.2.2.4 Evaluarea nivelului LDH eliberat

În vederea cuantificării LDH eliberate în mediul extracelular ca urmare a interacțiunii celulelor MC3T3-E1 cu biomaterialul testat, un volum de 50 μ L din supernatantul fiecărui godeu a fost prelevat și transferat într-o placă de 96 de godeuri, după finalizarea perioadei de incubare. LDH este o enzimă intracitoplasmatică implicată în conversia lactatului în piruvat în cadrul metabolismului celular anaerob, iar prezența acesteia în mediul extracelular este asociată cu deteriorarea membranei celulare, fiind un indicator specific al citotoxicității de tip necrotic. Pentru determinarea nivelului de LDH eliberat în urma expunerii osteoblastelor umane la biomaterialele ceramice investigate, s-a utilizat testul CyQUANT™ LDH Cytotoxicity Assay, conform protocolului furnizat de producător. Probele au fost incubate cu reactivii specifici ai kitului, iar absorbția optică a fost ulterior măsurată la o lungime de undă de 490 nm, utilizând un spectrofotometru. Nivelul de citotoxicitate a fost exprimat ca procent al LDH-ului eliberat, calculat prin raportarea valorilor obținute la cele ale controlului negativ, considerat standard de referință.

II.2.3. Rezultate și discuții

II.2.3.1. Testul de biocompatibilitate MTT

Rezultatele prezentate în Tabelul 1 și reprezentate grafic în Figura 1 evidențiază activitatea metabolică a celulelor MC3T3-E1 după 1 zi de incubare în contact cu suporturile funcționale pe bază de alginat, κ -caragenan și spirulină. Controlul negativ a fost considerat 100%, iar valorile probelor au fost raportate procentual față de acesta. Conform Tabelului 1, proba 11, corespunzătoare formulării fără spirulină pe raportul alginat/ κ -caragenan 1:1, a determinat o viabilitate celulară medie de $76,17 \pm 0,56\%$. Această valoare indică un răspuns celular acceptabil, peste pragul de 70% utilizat frecvent pentru aprecierea caracterului

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

necitotoxic al materialelor în testele in vitro. Totuși, comparativ cu probele care conțin spirulină, activitatea metabolică a fost mai redusă, ceea ce sugerează că matricea polizaharidică simplă susține viabilitatea celulară, dar nu are același efect favorabil asupra metabolismului celular.

Tabelul 1. Rezultatele testului MTT după o zi

Proba	11	11-0.5	11-1	21	21-0.5	21-1	CN
%	76.48449	98.19427	95.58198	64.80948	98.99527	93.64344	100
	76.49707	95.67405	95.11669	64.2881	99.22902	93.58031	100
	75.52181	95.60937	93.19862	63.12997	99.14169	92.10754	100

După cum se observă în Figura 1, adăugarea spirulinei în formulările de tip 11 a îmbunătățit clar răspunsul celular. Proba 11-0.5 a prezentat o viabilitate medie de $96,49 \pm 1,47\%$, foarte apropiată de controlul negativ, iar proba 11-1 a înregistrat o viabilitate de $94,63 \pm 1,26\%$. Aceste rezultate, prezentate în Tabelul 1, indică faptul că spirulina are un efect benefic asupra activității metabolice a celulelor MC3T3-E1. Totuși, pentru raportul alginat/ κ -caragenan 1:1, concentrația de 0,5% spirulină pare mai favorabilă decât cea de 1%, deoarece a generat o viabilitate ușor mai ridicată. În cazul formulărilor de tip 21, diferențele dintre probe au fost mai evidente. Conform Tabelului 1, proba 21, fără spirulină, a înregistrat cea mai scăzută viabilitate celulară dintre toate probele analizate, cu o valoare medie de $64,08 \pm 0,86\%$. Această valoare se situează sub pragul de 70%, sugerând un efect nefavorabil al raportului alginat/ κ -caragenan 2:1 asupra activității metabolice celulare în absența spirulinei, cel puțin după primele 24 h de contact.

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 contrast, proba 21-0.5 a prezentat cea mai bună viabilitate celulară dintre toate formulările, cu o valoare medie de $99,12 \pm 0,12\%$, practic echivalentă cu cea a controlului negativ. Acest rezultat este evidențiat atât în Tabelul 1, prin valorile foarte apropiate între replici, cât și în Figura 1, unde bara corespunzătoare probei 21-0.5 se situează aproape de nivelul controlului negativ. Această formulare indică un profil biocompatibil foarte bun și sugerează că raportul alginat/ κ -caragenan 2:1, combinat cu 0,5% spirulină, reprezintă cea mai echilibrată compoziție pentru menținerea activității metabolice a celulelor MC3T3-E1 după 1 zi de incubare. Proba 21-1 a prezentat, de asemenea, un răspuns celular favorabil, cu o viabilitate medie de $93,11 \pm 0,87\%$, conform Tabelului 1. Deși această valoare indică un comportament biocompatibil, ea este mai mică decât cea obținută pentru proba 21-0.5. Astfel, creșterea concentrației de spirulină la 1% nu a îmbunătățit suplimentar viabilitatea celulară. Este posibil ca o concentrație mai mare de particule de spirulină să influențeze microstructura suportului, interacțiunea celulă-material sau difuzia locală a nutrienților, fără a induce însă un efect citotoxic major la acest interval de timp.

Analiza comparativă din Figura 1 arată că probele cu spirulină au susținut mai bine viabilitatea celulară decât probele fără spirulină. Cele mai bune rezultate au fost obținute pentru 21-0.5, cu $99,12 \pm 0,12\%$, urmată de 11-0.5, cu $96,49 \pm 1,47\%$, 11-1, cu $94,63 \pm 1,26\%$, și 21-1, cu $93,11 \pm 0,87\%$. Cele mai reduse valori au fost observate pentru probele fără spirulină, în special pentru 21, cu $64,08 \pm 0,86\%$.

În ansamblu, datele din Tabelul 1 și reprezentarea grafică din Figura 1 indică faptul că spirulina are un efect favorabil asupra viabilității celulelor MC3T3-E1 după 1 zi de incubare. Cea mai bună probă a fost 21-0.5, deoarece a prezentat cea mai ridicată viabilitate celulară, cea mai mică variație între replici și un comportament aproape identic cu cel al controlului negativ. Prin urmare, formularea 21-0.5, bazată pe raport alginat/ κ -caragenan 2:1 și 0,5% spirulină, poate fi considerată compoziția optimă din punct de vedere al biocompatibilității inițiale.

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. Viabilitatea celulară a celulelor MC3T3-E1 determinată prin testul MTT după 1 zi de incubare în contact cu suporturile funcționale pe bază de alginat, κ -caragenan și spirulină. Diferențele semnificative statistic față de controlul negativ au fost marcate cu $**p<0,01$ și $****p<0,0001$.

Rezultatele prezentate în Tabelul 2 și reprezentate grafic în Figura 2 evidențiază activitatea metabolică a celulelor MC3T3-E1 după 2 zile de incubare în contact cu suporturile funcționale pe bază de alginat, κ -caragenan și spirulină. Controlul negativ a fost considerat 100%, iar valorile obținute pentru probe au fost raportate procentual față de acesta. Conform Tabelului 2, proba 11, corespunzătoare formulării fără spirulină pe raportul alginat/ κ -caragenan 1:1, a prezentat o viabilitate celulară medie de $56,31 \pm 0,92\%$. Această valoare este semnificativ mai redusă față de controlul negativ și se situează sub pragul de 70%, sugerând că această

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

compoziție nu a susținut eficient activitatea metabolică a celulelor MC3T3-E1 după 2 zile de contact. Comparativ cu rezultatele obținute după 1 zi, se observă o scădere importantă a viabilității, ceea ce poate indica o compatibilitate celulară limitată a matricei 11 în absența spirulinei. Proba 11-0.5, care conține 0,5% spirulină, a înregistrat o viabilitate celulară medie de $58,12 \pm 0,56\%$, conform Tabelului 2. Deși prezența spirulinei a determinat o ușoară creștere față de proba 11, valoarea a rămas sub 70%, indicând un răspuns metabolic redus. După cum se observă în Figura 2, proba 11-0.5 are o valoare apropiată de proba 11, ceea ce sugerează că, în cazul raportului alginat/κ-caragenan 1:1, concentrația de 0,5% spirulină nu a fost suficientă pentru menținerea unei viabilități celulare apropiate de control după 2 zile.

Tabelul 2. Rezultatele testului MTT după două zile.

Proba	11	11-0.5	11-1	21	21-0.5	21-1	CN
%	57.20313	58.22476	100.4328	77.51982	80.18684	102.882	100
	56.36893	57.51216	101.4571	77.7698	79.71916	100.983	100
	55.37028	58.60923	100.7433	75.54355	80.18263	102.2569	100

În schimb, proba 11-1 a prezentat o viabilitate celulară medie de $100,88 \pm 0,53\%$, foarte apropiată de controlul negativ. Această valoare, evidențiată atât în Tabelul 2, cât și în Figura 2, indică un comportament biocompatibil foarte bun și sugerează că, pentru raportul alginat/κ-caragenan 1:1, creșterea concentrației de spirulină la 1% a avut un efect favorabil asupra activității metabolice a celulelor MC3T3-E1. Spre deosebire de rezultatele după 1 zi, unde 11-0.5 a fost ușor mai favorabilă decât 11-1, după 2 zile formularea 11-1 a susținut cel mai bine viabilitatea celulară dintre probele de tip 11. În cazul formulărilor de tip 21, proba 21, fără spirulină, a prezentat o viabilitate medie de $76,94 \pm 1,22\%$, conform Tabelului 2. Această valoare este peste pragul de 70% și indică un profil biocompatibil acceptabil după 2 zile de incubare. Comparativ cu proba 11, care nu conține spirulină, formularea 21 a avut un

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

comportament celular mai bun, ceea ce sugerează că raportul alginat/ κ -caragenan 2:1 poate susține mai eficient activitatea metabolică a celulelor MC3T3-E1 la acest interval de timp. Proba 21-0.5 a înregistrat o viabilitate celulară medie de $80,03 \pm 0,27\%$, valoare mai ridicată decât cea a probei 21. Acest rezultat indică un efect favorabil al spirulinei la concentrația de 0,5% în cadrul raportului alginat/ κ -caragenan 2:1. După cum se observă în Figura 2, proba 21-0.5 prezintă o creștere moderată a activității metabolice față de proba 21, însă nu atinge nivelul controlului negativ. Variabilitatea redusă între replici indică o bună reproductibilitate a răspunsului celular.

Cea mai bună probă după 2 zile a fost 21-1, care a prezentat o viabilitate celulară medie de $102,04 \pm 0,97\%$, ușor peste controlul negativ. Acest rezultat indică faptul că formularea bazată pe raport alginat/ κ -caragenan 2:1 și 1% spirulină a susținut cel mai eficient activitatea metabolică a celulelor MC3T3-E1 după 2 zile de incubare. Valoarea peste 100% nu trebuie interpretată ca proliferare certă fără teste suplimentare, dar sugerează o activitate metabolică cel puțin comparabilă cu cea a celulelor din controlul negativ.

Analiza comparativă din Figura 2 arată că răspunsul celular după 2 zile a fost puternic influențat de concentrația de spirulină. Cele mai ridicate valori au fost obținute pentru 21-1, cu $102,04 \pm 0,97\%$, și 11-1, cu $100,88 \pm 0,53\%$, ambele apropiate sau ușor superioare controlului negativ. La polul opus, cele mai reduse valori au fost observate pentru 11, cu $56,31 \pm 0,92\%$, și 11-0.5, cu $58,12 \pm 0,56\%$, indicând un răspuns celular nefavorabil pentru aceste formulări după 2 zile. În ansamblu, datele din Tabelul 2 și reprezentarea grafică din Figura 2 indică faptul că, după 2 zile de incubare, formulările cu 1% spirulină au avut cel mai favorabil efect asupra viabilității celulelor MC3T3-E1. Cea mai bună probă a fost 21-1, cu $102,04 \pm 0,97\%$, urmată foarte apropiat de 11-1, cu $100,88 \pm 0,53\%$. Prin urmare, pentru intervalul de 2 zile, formularea 21-1, bazată pe raport alginat/ κ -caragenan 2:1 și 1% spirulină, poate fi considerată compoziția cu cel mai bun răspuns biologic, în timp ce probele 11 și 11-0.5 au prezentat cele mai slabe rezultate.

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

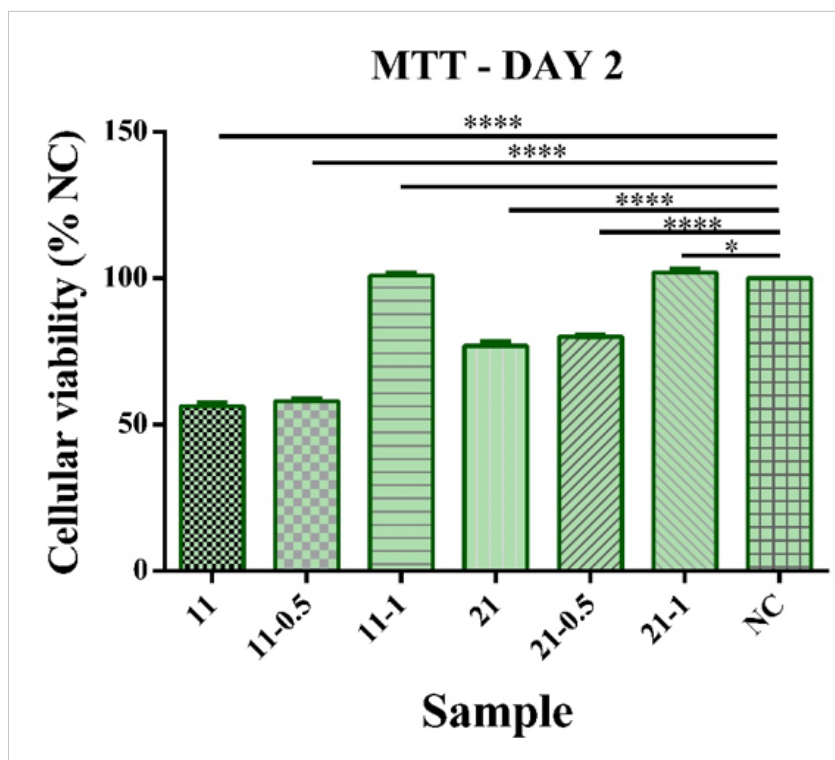


Figura 2. Viabilitatea celulară a celulelor MC3T3-E1 determinată prin testul MTT după 2 zile de incubare în contact cu suporturile funcționale pe bază de alginat, κ -caragenan și spirulină. Diferențele semnificative statistic față de controlul negativ au fost marcate cu $*p<0,05$ și $****p<0,0001$.

Rezultatele prezentate în Tabelul 3 și reprezentate grafic în Figura 3 evidențiază activitatea metabolică a celulelor MC3T3-E1 după 5 zile de incubare în contact cu suporturile funcționale pe bază de alginat, κ -caragenan și spirulină. Controlul negativ a fost considerat 100%, iar valorile probelor au fost raportate procentual față de acesta. Conform Tabelului 3, proba 11, corespunzătoare formulării fără spirulină pe raportul alginat/ κ -caragenan 1:1, a prezentat o viabilitate celulară medie de $40,55 \pm 0,14\%$. Această valoare este mult sub pragul de 70% utilizat frecvent pentru aprecierea caracterului necitotoxic al materialelor în testele in vitro și indică o reducere importantă a activității metabolice după 5 zile de contact. Comparativ

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

cu intervalele anterioare, scăderea viabilității sugerează că matricea 11, în absența spirulinei, nu susține eficient menținerea celulelor MC3T3-E1 pe termen mai lung. Proba 11-0.5, care conține 0,5% spirulină, a înregistrat o viabilitate celulară medie de $71,05 \pm 0,68\%$, conform Tabelului 3. Această valoare se situează ușor peste pragul de 70%, indicând un răspuns celular acceptabil. După cum se observă în Figura 3, adăugarea spirulinei la concentrația de 0,5% a îmbunătățit clar viabilitatea comparativ cu proba 11, ceea ce confirmă efectul favorabil al spirulinei asupra activității metabolice a celulelor. Totuși, viabilitatea rămâne mai redusă decât în cazul probelor cu 1% spirulină.

Tabelul 3. Rezultatele testului MTT după cinci zile.

Proba	11	11-0.5	11-1	21	21-0.5	21-1	CN
%	40.58635	71.41306	91.5138	41.29447	105.2703	93.12859	100
	40.67178	71.46478	92.94674	41.18257	103.3569	93.82343	100
	40.39174	70.26538	90.37602	40.54452	99.13536	92.94536	100

Proba 11-1 a prezentat o viabilitate celulară medie de $91,61 \pm 1,29\%$, valoare apropiată de controlul negativ și compatibilă cu un profil biocompatibil bun. Acest rezultat, evidențiat atât în Tabelul 3, cât și în Figura 3, indică faptul că, pentru raportul alginat/κ-caragenan 1:1, creșterea concentrației de spirulină la 1% a susținut semnificativ mai bine activitatea metabolică a celulelor MC3T3-E1 după 5 zile. Comparativ cu proba 11-0.5, creșterea viabilității este considerabilă, ceea ce sugerează un efect dependent de concentrația de spirulină în această matrice polizaharidică. În cazul formulărilor de tip 21, proba 21, fără spirulină, a prezentat o viabilitate celulară medie de $41,01 \pm 0,40\%$, conform Tabelului 3. Această valoare este foarte apropiată de cea obținută pentru proba 11 și indică o activitate metabolică redusă după 5 zile de incubare. Astfel, în absența spirulinei, nici raportul alginat/κ-caragenan 2:1 nu 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

fost suficient pentru menținerea unei viabilități celulare adecvate pe durata perioadei investigate.

Prin contrast, proba 21-0.5 a prezentat cea mai ridicată viabilitate celulară dintre toate formulările analizate, cu o valoare medie de $102,59 \pm 3,14\%$. Acest rezultat, vizibil în Figura 3, arată că formularea bazată pe raport alginat/ κ -caragenan 2:1 și 0,5% spirulină a susținut cel mai eficient activitatea metabolică a celulelor MC3T3-E1 după 5 zile de incubare. Valoarea ușor peste 100% sugerează o activitate metabolică comparabilă sau mai mare decât cea a controlului negativ, însă nu poate fi interpretată singură ca proliferare celulară certă fără teste complementare. Proba 21-1 a înregistrat, de asemenea, un răspuns celular favorabil, cu o viabilitate medie de $93,30 \pm 0,46\%$, conform Tabelului 3. Această valoare indică o bună compatibilitate cu celulele MC3T3-E1 și confirmă efectul benefic al spirulinei în formulările de tip 21. Totuși, viabilitatea a fost mai redusă decât în cazul probei 21-0.5, ceea ce sugerează că, pentru raportul alginat/ κ -caragenan 2:1, concentrația de 0,5% spirulină este mai favorabilă decât cea de 1% după 5 zile de incubare. Analiza comparativă din Figura 3 arată că probele fără spirulină, 11 și 21, au determinat cele mai scăzute valori ale viabilității celulare, de $40,55 \pm 0,14\%$, respectiv $41,01 \pm 0,40\%$. În schimb, probele care conțin spirulină au susținut mai bine activitatea metabolică, efectul fiind mai pronunțat pentru 21-0.5, cu $102,59 \pm 3,14\%$, urmată de 21-1, cu $93,30 \pm 0,46\%$, și 11-1, cu $91,61 \pm 1,29\%$. Proba 11-0.5 a avut un răspuns intermediar, cu $71,05 \pm 0,68\%$, situându-se la limita inferioară a intervalului considerat acceptabil pentru biocompatibilitate.

În ansamblu, datele din Tabelul 3 și reprezentarea grafică din Figura 3 indică faptul că spirulina are un rol important în menținerea viabilității celulelor MC3T3-E1 după 5 zile de incubare. Cea mai bună probă a fost 21-0.5, cu $102,59 \pm 3,14\%$, ceea ce susține alegerea acestei formulări ca variantă optimă pentru intervalul de 5 zile. Această compoziție, bazată pe raport alginat/ κ -caragenan 2:1 și 0,5% spirulină, a prezentat cel mai bun echilibru între matricea

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

polizaharidică și componenta bioactivă, menținând activitatea metabolică la un nivel comparabil cu cel al controlului negativ.

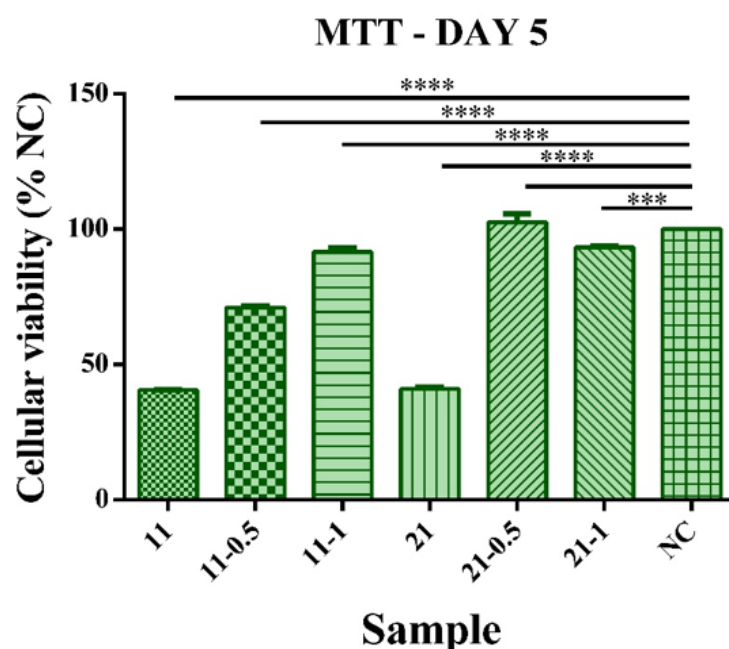


Figura 3. Viabilitatea celulară a celulelor MC3T3-E1 determinată prin testul MTT după 5 zile de incubare în contact cu suporturile funcționale pe bază de alginat, κ -caragenan și spirulină. Diferențele semnificative statistic față de controlul negativ au fost marcate cu *** $p < 0,001$ și **** $p < 0,0001$.

II.2.3.2. Discuții privind rezultatele testelor de biocompatibilitate MTT

Rezultatele obținute prin testul MTT arată că viabilitatea celulelor MC3T3-E1 a fost influențată semnificativ de compoziția suporturilor funcționale, în special de prezența și concentrația spirulinei. În general, probele fără spirulină, respectiv 11 și 21, au determinat cele mai reduse valori ale viabilității celulare, mai ales după 5 zile de incubare, ceea ce sugerează că matricea formată doar din alginat și κ -caragenan nu a fost suficientă pentru menținerea unui răspuns metabolic favorabil pe termen mai lung. După 1 zi de incubare, cele mai bune rezultate

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

au fost observate pentru probele care conțin spirulină. Proba 21-0.5 a prezentat cea mai ridicată viabilitate, de $99,12 \pm 0,12\%$, urmată de 11-0.5, cu $96,49 \pm 1,47\%$, 11-1, cu $94,63 \pm 1,26\%$, și 21-1, cu $93,11 \pm 0,87\%$. Aceste valori, apropiate de controlul negativ, indică un profil biocompatibil bun încă din primele 24 h de contact. În schimb, probele 11 și 21 au avut valori mai reduse, de $76,17 \pm 0,56\%$, respectiv $64,08 \pm 0,86\%$, ceea ce evidențiază importanța introducerii spirulinei în compoziția suporturilor.

După 2 zile, comportamentul probelor a fost mai diferențiat. Formulările 11 și 11-0.5 au prezentat viabilități scăzute, de $56,31 \pm 0,92\%$ și $58,12 \pm 0,56\%$, situându-se sub pragul de 70%. În schimb, probele cu 1% spirulină au avut cele mai bune rezultate: 11-1 a atins $100,88 \pm 0,53\%$, iar 21-1 a prezentat cea mai mare valoare, de $102,04 \pm 0,97\%$. Aceste rezultate sugerează că, la acest interval, concentrația mai ridicată de spirulină a susținut mai eficient activitatea metabolică a celulelor MC3T3-E1. Probele 21 și 21-0.5 au avut valori intermediare, de $76,94 \pm 1,22\%$ și $80,03 \pm 0,27\%$, indicând un răspuns celular acceptabil, dar mai redus comparativ cu formulările cu 1% spirulină.

După 5 zile, diferențele dintre probe au devenit mai evidente. Formulările fără spirulină au prezentat cele mai scăzute valori, $40,55 \pm 0,14\%$ pentru proba 11 și $41,01 \pm 0,40\%$ pentru proba 21. Acest rezultat indică o reducere accentuată a activității metabolice în absența spirulinei și sugerează o compatibilitate limitată a acestor compoziții pe durată mai lungă. În schimb, adăugarea spirulinei a îmbunătățit clar răspunsul celular. Proba 11-0.5 a atins $71,05 \pm 0,68\%$, iar 11-1 a crescut până la $91,61 \pm 1,29\%$. Pentru raportul 2:1, proba 21-1 a prezentat o viabilitate de $93,30 \pm 0,46\%$, în timp ce proba 21-0.5 a avut cea mai bună valoare, de $102,59 \pm 3,14\%$.

În ansamblu, rezultatele indică faptul că spirulina are un efect favorabil asupra viabilității celulelor MC3T3-E1, contribuind la menținerea activității metabolice pe durata incubării. Totuși, efectul nu este strict proporțional cu concentrația. În unele cazuri, cum ar fi probele 11-1 și 21-1 după 2 zile, concentrația de 1% a fost mai eficientă, însă după 5 zile cea mai bună

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

formulare a fost 21-0.5. Acest comportament sugerează că răspunsul celular depinde de echilibrul dintre raportul alginat/ κ -caragenan și cantitatea de spirulină, nu doar de prezența componentei bioactive.

Dintre toate probele analizate, formularea 21-0.5 poate fi considerată cea mai bună, deoarece a prezentat un profil biologic favorabil pe întreaga perioadă experimentală. Aceasta a avut o viabilitate aproape identică cu controlul negativ după 1 zi, $99,12 \pm 0,12\%$, a rămas peste pragul de biocompatibilitate după 2 zile, $80,03 \pm 0,27\%$, și a atins cea mai ridicată valoare după 5 zile, $102,59 \pm 3,14\%$. Prin urmare, combinația dintre raportul alginat/ κ -caragenan 2:1 și 0,5% spirulină pare să ofere cel mai bun echilibru între stabilitatea matricei și susținerea răspunsului metabolic al celulelor MC3T3-E1.

II.2.3.3. Testul de biocompatibilitate LDH

Rezultatele testului LDH după 1 zi de incubare au evidențiat nivelul de eliberare a lactat-dehidrogenazei din celulele MC3T3-E1 aflate în contact cu suporturile funcționale pe bază de alginat, κ -caragenan și spirulină. Spre deosebire de testul MTT, unde valorile mai mari indică o activitate metabolică mai ridicată, în cazul testului LDH valorile crescute indică o afectare mai mare a membranei celulare și, implicit, un posibil efect citotoxic. Controlul negativ a fost considerat 1, iar valorile probelor au fost exprimate relativ la acesta. Proba 11, corespunzătoare formulării fără spirulină pe raportul alginat/ κ -caragenan 1:1, a prezentat un nivel mediu de LDH de $1,05 \pm 0,04$. Această valoare este foarte apropiată de controlul negativ, ceea ce sugerează că proba nu a produs o afectare majoră a membranei celulare după 1 zi de contact. Deși nivelul LDH este ușor mai ridicat decât cel al controlului, diferența este redusă și indică un răspuns celular acceptabil. Proba 11-0.5, care conține 0,5% spirulină, a avut o valoare medie de $1,01 \pm 0,12$, practic comparabilă cu cea a controlului negativ. Variabilitatea mai mare între replici arată un răspuns ușor mai fluctuant, însă media indică un nivel redus de citotoxicitate. Acest rezultat sugerează că introducerea spirulinei la 0,5% în matricea 1:1 nu 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

determinat o creștere relevantă a eliberării LDH. Pentru proba 11-1, nivelul mediu de LDH a fost de $0,89 \pm 0,07$, valoare mai mică decât cea a controlului negativ. Acest rezultat indică o eliberare redusă de LDH și sugerează o bună menținere a integrității membranei celulare după 1 zi de incubare. Dintre formulările de tip 11, proba 11-1 a prezentat cel mai favorabil profil din perspectiva testului LDH.

Tabelul 4. Rezultatele testului LDH după o zi.

Proba	11	11-0.5	11-1	21	21-0.5	21-1	CN
%	1.032672	1.076314	0.944188	1.068101	1.131407	1.058869	1
	1.110988	1.141498	0.853775	1.065991	1.158686	1.104911	1
	1.029523	0.97223	0.819795	0.935039	0.971244	0.943309	1
	1.036094	0.859305	0.959573	1.072484	1.092372	0.944435	1

În cazul formulărilor de tip 21, proba 21, fără spirulină, a înregistrat un nivel mediu de LDH de $1,04 \pm 0,07$, apropiat de controlul negativ. Această valoare indică faptul că raportul alginat/ κ -caragenan 2:1, în absența spirulinei, nu a determinat o citotoxicitate acută evidentă după 24 h, deși valoarea este ușor peste control. Proba 21-0.5 a prezentat cea mai ridicată valoare medie a LDH, de $1,09 \pm 0,08$. Această creștere sugerează o eliberare ușor mai mare de LDH comparativ cu celelalte probe, dar diferența față de controlul negativ este moderată. Prin urmare, rezultatul nu indică o citotoxicitate severă, ci mai degrabă o ușoară afectare a integrității membranei celulare în primele 24 h. Interpretarea acestei probe trebuie corelată cu rezultatele MTT, unde 21-0.5 a prezentat cea mai ridicată viabilitate celulară după 1 zi, de $99,12 \pm 0,12\%$. Astfel, chiar dacă nivelul LDH este ușor crescut, activitatea metabolică a celulelor a fost foarte bine menținută.

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. Nivelul de LDH eliberat de celulele MC3T3-E1 după 1 zi de incubare în contact cu suporturile funcționale pe bază de alginat, κ -caragenan și spirulină, exprimat relativ la controlul negativ.

Proba 21-1 a avut o valoare medie de $1,01 \pm 0,08$, apropiată de controlul negativ. Acest rezultat indică un nivel redus de eliberare LDH și sugerează că prezența spirulinei la 1% în matricea 2:1 nu a produs un efect citotoxic important după 1 zi de incubare. Comparativ între probe, cel mai redus nivel de LDH a fost observat pentru 11-1, cu $0,89 \pm 0,07$, ceea ce indică cea mai bună menținere a integrității membranei celulare la acest interval. Cele mai apropiate valori de control au fost obținute pentru 11-0.5 și 21-1, ambele cu aproximativ 1,01, urmate de 21, cu 1,04, și 11, cu 1,05. Proba 21-0.5 a avut cea mai ridicată valoare, $1,09 \pm 0,08$, dar creșterea rămâne moderată. În ansamblu, rezultatele testului LDH după 1 zi indică faptul că suporturile analizate nu au indus un efect citotoxic acut major asupra celulelor MC3T3-E1. Valorile LDH au fost apropiate de controlul negativ pentru majoritatea probelor, ceea ce sugerează menținerea integrității membranei celulare în primele 24 h de contact. Din perspectiva exclusivă a testului LDH, proba 11-1 a avut cel mai bun comportament, deoarece

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

a prezentat cea mai redusă eliberare de LDH. Totuși, prin corelare cu rezultatele MTT, proba 21-0.5 rămâne foarte importantă, deoarece a susținut cea mai ridicată activitate metabolică după 1 zi, chiar dacă a determinat o ușoară creștere a LDH față de control.

Rezultatele testului LDH după 2 zile de incubare au evidențiat nivelul de eliberare a lactat-dehidrogenazei din celulele MC3T3-E1 aflate în contact cu suporturile funcționale pe bază de alginat, κ -caragenan și spirulină. În cazul acestui test, valorile mai mari indică o afectare mai accentuată a membranei celulare, în timp ce valorile apropiate sau mai mici față de controlul negativ sugerează un nivel redus de citotoxicitate. Conform Tabelului 5, proba 11, corespunzătoare formulării fără spirulină pe raportul alginat/ κ -caragenan 1:1, a prezentat un nivel mediu de LDH de $0,95 \pm 0,07$. Această valoare este ușor mai mică decât cea a controlului negativ, ceea ce sugerează că proba nu a determinat o afectare importantă a membranei celulare după 2 zile de incubare.

Proba 11-0.5, care conține 0,5% spirulină, a înregistrat o valoare medie de $1,06 \pm 0,07$. Aceasta reprezintă cea mai ridicată valoare dintre probele analizate la acest interval, indicând o eliberare ușor crescută de LDH față de controlul negativ. Totuși, creșterea este moderată și nu sugerează o citotoxicitate severă. Comparativ cu proba 11, introducerea spirulinei la 0,5% în matricea 1:1 pare să fi determinat o ușoară creștere a eliberării LDH.

Pentru proba 11-1, nivelul mediu de LDH a fost de $0,92 \pm 0,08$, valoare mai mică decât controlul negativ. Acest rezultat indică o bună menținere a integrității membranei celulare și sugerează un comportament favorabil al formulării cu 1% spirulină în raportul alginat/ κ -caragenan 1:1. Dintre formulările de tip 11, proba 11-1 a prezentat cel mai bun profil din perspectiva testului LDH după 2 zile.

În cazul formulărilor de tip 21, proba 21, fără spirulină, a prezentat un nivel mediu de LDH de $1,01 \pm 0,06$, practic similar cu cel al controlului negativ. Această valoare indică faptul că raportul alginat/ κ -caragenan 2:1, în absența spirulinei, nu a indus o citotoxicitate evidentă după 2 zile de contact. Proba 21-0.5 a avut o valoare medie de $0,96 \pm 0,08$, ușor sub controlul

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

negativ. Acest rezultat sugerează un nivel redus de eliberare LDH și indică menținerea integrității membranei celulare în prezența suportului cu 0,5% spirulină. Prin corelare cu rezultatele MTT, unde această probă a prezentat o viabilitate de $80,03 \pm 0,27\%$ după 2 zile, formularea 21-0.5 poate fi considerată biocompatibilă la acest interval experimental. Proba 21-1 a prezentat un nivel mediu de LDH de $0,93 \pm 0,05$, valoare mai mică decât controlul negativ și una dintre cele mai favorabile dintre toate probele analizate. Acest rezultat indică o eliberare redusă de LDH și sugerează că formularea cu raport alginat/ κ -caragenan 2:1 și 1% spirulină nu a afectat integritatea membranei celulare după 2 zile de incubare. Acest comportament este în acord cu rezultatele MTT, unde proba 21-1 a prezentat cea mai ridicată viabilitate celulară după 2 zile, de $102,04 \pm 0,97\%$.

Tabelul 5. Rezultatele testului LDH după două zile.

Proba	11	11-0.5	11-1	21	21-0.5	21-1	CN
%	0.97025	1.127589	0.969296	1.076396	1.027056	0.977715	1
	0.941884	0.994698	0.880197	0.968816	0.995958	0.920832	1
	1.035258	1.10572	0.99066	1.047251	0.969936	0.947499	1
	0.857865	1.014864	0.825512	0.940396	0.849315	0.86452	1

Proba 21-1 a prezentat un nivel mediu de LDH de $0,93 \pm 0,05$, valoare mai mică decât controlul negativ și una dintre cele mai favorabile dintre toate probele analizate. Acest rezultat indică o eliberare redusă de LDH și sugerează că formularea cu raport alginat/ κ -caragenan 2:1 și 1% spirulină nu a afectat integritatea membranei celulare după 2 zile de incubare. Acest comportament este în acord cu rezultatele MTT, unde proba 21-1 a prezentat cea mai ridicată viabilitate celulară după 2 zile, de $102,04 \pm 0,97\%$. Analiza comparativă din Figura 5 arată că majoritatea probelor au avut valori apropiate de controlul negativ sau ușor sub acesta. Cele mai mici niveluri de LDH au fost observate pentru 11-1, cu $0,92 \pm 0,08$, și 21-1, cu $0,93 \pm 0,05$,

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

ceea ce indică o bună menținere a integrității membranei celulare. Cea mai mare valoare a fost înregistrată pentru 11-0.5, cu $1,06 \pm 0,07$, însă creșterea față de control a fost redusă. În ansamblu, rezultatele LDH după 2 zile indică faptul că suporturile funcționale analizate nu au indus un efect citotoxic major asupra celulelor MC3T3-E1. Valorile au fost apropiate de controlul negativ pentru toate probele, iar formulările cu 1% spirulină, în special 21-1, au prezentat cel mai bun profil biologic prin combinarea unui nivel redus de LDH cu o viabilitate celulară ridicată observată în testul MTT. Astfel, după 2 zile de incubare, proba 21-1 poate fi considerată cea mai favorabilă, deoarece a susținut activitatea metabolică celulară și a menținut un nivel scăzut de eliberare LDH.

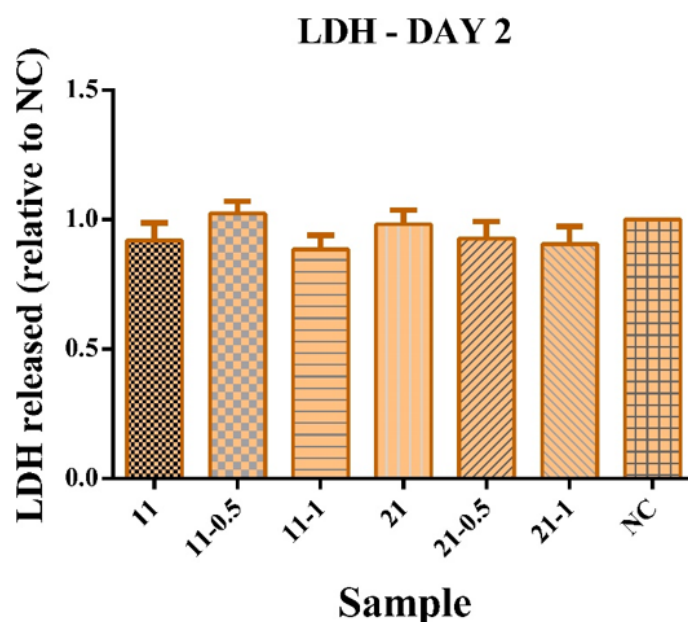


Figura 5. Nivelul de LDH eliberat de celulele MC3T3-E1 după 2 zile de incubare în contact cu suporturile funcționale pe bază de alginat, κ -caragenan și spirulină, exprimat relativ la controlul negativ.

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 testului LDH după 5 zile de incubare au evidențiat nivelul de eliberare a lactat-dehidrogenazei din celulele MC3T3-E1 aflate în contact cu suporturile funcționale pe bază de alginat, κ -caragenan și spirulină. În cazul acestui test, valorile mai mari decât controlul negativ indică o posibilă afectare a membranei celulare, în timp ce valorile apropiate de 1 sugerează un nivel redus de citotoxicitate. Conform Tabelului 6, proba 11, corespunzătoare formulării fără spirulină pe raportul alginat/ κ -caragenan 1:1, a prezentat un nivel mediu de LDH de $0,95 \pm 0,05$. Această valoare este ușor sub controlul negativ, ceea ce indică o eliberare redusă de LDH și sugerează că proba nu a indus o afectare importantă a membranei celulare după 5 zile de incubare.

Proba 11-0.5, care conține 0,5% spirulină, a înregistrat o valoare medie de $1,05 \pm 0,03$. Aceasta este ușor peste controlul negativ, indicând o creștere moderată a eliberării LDH. Totuși, diferența față de control este redusă, iar rezultatul nu sugerează o citotoxicitate accentuată. Comparativ cu proba 11, introducerea spirulinei la 0,5% a determinat o creștere ușoară a LDH, dar valorile rămân apropiate de control. Pentru proba 11-1, nivelul mediu de LDH a fost de $1,02 \pm 0,05$, valoare foarte apropiată de controlul negativ. Acest rezultat indică menținerea integrității membranei celulare și sugerează că formularea cu 1% spirulină, în raport alginat/ κ -caragenan 1:1, nu a produs un efect citotoxic evident după 5 zile. Corelat cu rezultatele MTT, unde proba 11-1 a prezentat o viabilitate de $91,61 \pm 1,29\%$, această formulare arată un comportament biologic favorabil.

În cazul formulărilor de tip 21, proba 21, fără spirulină, a prezentat un nivel mediu de LDH de $1,04 \pm 0,04$, ușor peste controlul negativ. Această valoare indică o eliberare moderată de LDH, dar fără o creștere majoră. Totuși, rezultatul trebuie interpretat împreună cu datele MTT, unde proba 21 a avut o viabilitate scăzută, de $41,01 \pm 0,40\%$. Astfel, reducerea activității metabolice observată prin MTT nu este însoțită de o creștere puternică a LDH, ceea ce poate sugera mai degrabă o activitate metabolică redusă decât o liză celulară accentuată. Proba 21-0.5 a înregistrat cel mai ridicat nivel mediu de LDH, de $1,08 \pm 0,07$. Această valoare indică o

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

eliberare ușor crescută de LDH comparativ cu controlul negativ, dar creșterea rămâne moderată. În ciuda acestui nivel ușor mai ridicat, proba 21-0.5 a prezentat cea mai bună viabilitate celulară la testul MTT după 5 zile, de $102,59 \pm 3,14\%$. Prin urmare, această formulare nu poate fi considerată citotoxică pe baza LDH, ci mai degrabă prezintă o activitate metabolică foarte bună, asociată cu o eliberare LDH apropiată de control. Proba 21-1 a prezentat o valoare medie de $1,10 \pm 0,08$, fiind ușor peste controlul negativ și apropiată de valoarea probei 21-0.5. Acest rezultat sugerează o eliberare moderat crescută de LDH după 5 zile. Totuși, valoarea nu indică o citotoxicitate severă, iar prin corelare cu rezultatele MTT, unde proba 21-1 a avut o viabilitate de $93,30 \pm 0,46\%$, formularea poate fi considerată compatibilă cu celulele MC3T3-E1.

Tabelul 6. Rezultatele testului LDH după cinci zile.

Proba	11	11-0.5	11-1	21	21-0.5	21-1	CN
%	0.926798	1.040508	1.042558	1.054527	1.11781	0.980716	1
	1.021518	1.084021	0.954403	1.08607	1.144817	1.116298	1
	0.930321	1.065436	1.076504	1.020416	0.98205	1.181855	1
	0.912043	1.016376	1.015869	0.999212	1.090715	1.113337	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

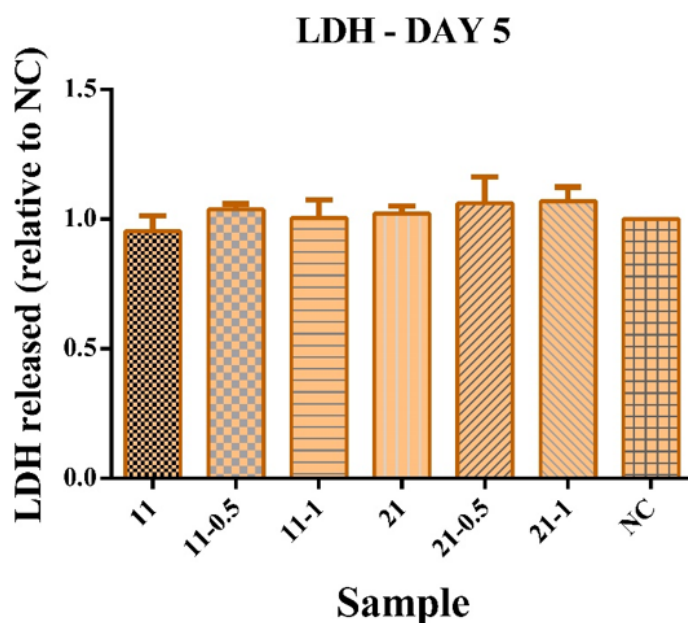


Figura 6. Nivelul de LDH eliberat de celulele MC3T3-E1 după 5 zile de incubare în contact cu suporturile funcționale pe bază de alginat, κ -caragenan și spirulină, exprimat relativ la controlul negativ.

Analiza comparativă din Figura 6 arată că toate probele au prezentat valori apropiate de controlul negativ, situate în general în jurul valorii 1. Cele mai reduse niveluri de LDH au fost observate pentru 11, cu $0,95 \pm 0,05$, iar cele mai ridicate pentru 21-1, cu $1,10 \pm 0,08$, și 21-0.5, cu $1,08 \pm 0,07$. Diferențele dintre probe sunt moderate, ceea ce sugerează că suporturile funcționale nu au produs o afectare severă a membranei celulare după 5 zile de incubare. În ansamblu, rezultatele LDH după 5 zile indică faptul că suporturile analizate nu au indus un efect citotoxic major asupra celulelor MC3T3-E1. Valorile apropiate de controlul negativ sugerează menținerea relativă a integrității membranei celulare. Prin corelare cu rezultatele MTT, proba 21-0.5 rămâne cea mai favorabilă formulare, deoarece a prezentat cea mai ridicată viabilitate celulară după 5 zile, în timp ce nivelul LDH a fost doar ușor crescut față 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

Astfel, raportul alginat/ κ -caragenan 2:1 combinat cu 0,5% spirulină pare să ofere cel mai bun echilibru între susținerea activității metabolice și menținerea integrității celulare.

II.2.3.4. Discuții privind rezultatele testelor de biocompatibilitate LDH

Rezultatele testului LDH au permis evaluarea integrității membranei celulare a celulelor MC3T3-E1 după contactul cu suporturile funcționale pe bază de alginat, κ -caragenan și spirulină. Spre deosebire de testul MTT, care oferă informații privind activitatea metabolică celulară, testul LDH evidențiază gradul de afectare celulară prin cuantificarea lactat-dehidrogenazei eliberate în mediul de cultură. Prin urmare, valorile crescute ale LDH pot indica o afectare mai accentuată a membranei celulare, în timp ce valorile apropiate sau mai mici decât controlul negativ sugerează un nivel redus de citotoxicitate.

După 1 zi de incubare, toate probele au prezentat valori apropiate de controlul negativ, ceea ce indică absența unui efect citotoxic acut major. Proba 11-1 a avut cel mai redus nivel de LDH, de $0,89 \pm 0,07$, sugerând cea mai bună menținere a integrității membranei celulare la acest interval. Probele 11-0.5 și 21-1 au avut valori apropiate de control, de aproximativ 1,01, iar probele 11 și 21 au prezentat valori ușor crescute, de $1,05 \pm 0,04$ și $1,04 \pm 0,07$. Cea mai mare valoare a fost observată pentru proba 21-0.5, de $1,09 \pm 0,08$, însă creșterea față de control a fost moderată și nu indică o citotoxicitate severă. După 2 zile, nivelul de LDH a rămas apropiat de controlul negativ pentru toate formulările analizate. Cele mai favorabile valori au fost obținute pentru probele 11-1 și 21-1, cu $0,92 \pm 0,08$, respectiv $0,93 \pm 0,05$, indicând o eliberare redusă de LDH și o bună menținere a integrității membranei celulare. Proba 11 a avut o valoare de $0,95 \pm 0,07$, iar proba 21-0.5 a înregistrat $0,96 \pm 0,08$, ambele fiind ușor sub controlul negativ. Proba 21 a prezentat o valoare de $1,01 \pm 0,06$, foarte apropiată de control, în timp ce proba 11-0.5 a avut cea mai ridicată valoare, de $1,06 \pm 0,07$. Chiar și în acest caz, creșterea a fost redusă, sugerând că suporturile nu au indus un efect citotoxic important după 2 zile de incubare.

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

După 5 zile, valorile LDH au rămas în general apropiate de controlul negativ, ceea ce indică menținerea unui profil de biocompatibilitate acceptabil pe durata perioadei investigate. Proba 11 a prezentat cel mai redus nivel de LDH, de $0,95 \pm 0,05$, sugerând o eliberare scăzută a enzimei în mediul de cultură. Probele 11-1 și 21 au avut valori apropiate de control, de $1,02 \pm 0,05$ și $1,04 \pm 0,04$, iar proba 11-0.5 a prezentat o valoare de $1,05 \pm 0,03$. Cele mai ridicate valori au fost observate pentru probele 21-0.5 și 21-1, cu $1,08 \pm 0,07$, respectiv $1,10 \pm 0,08$. Totuși, aceste creșteri au fost moderate și nu sugerează o afectare severă a membranei celulare. Analiza comparativă pe toate cele trei intervale de timp arată că suporturile funcționale pe bază de alginat, κ -caragenan și spirulină nu au determinat o citotoxicitate majoră asupra celulelor MC3T3-E1. Valorile LDH au rămas apropiate de controlul negativ, fără creșteri accentuate care să indice lezarea masivă a membranei celulare. Diferențele dintre probe au fost moderate, ceea ce sugerează că toate compozițiile investigate prezintă un nivel acceptabil de compatibilitate celulară din perspectiva eliberării LDH. Din punct de vedere strict al testului LDH, cele mai bune rezultate au fost observate pentru probele 11-1 și 21-1, mai ales după 2 zile, când acestea au prezentat cele mai reduse valori ale LDH, de $0,92 \pm 0,08$ și $0,93 \pm 0,05$. Aceste rezultate indică o bună menținere a integrității membranei celulare în prezența formulărilor care conțin 1% spirulină. De asemenea, proba 11 a avut valori reduse după 5 zile, însă această observație trebuie interpretată cu prudență, deoarece rezultatele MTT au indicat o viabilitate celulară scăzută pentru această probă. Astfel, un nivel redus de LDH nu înseamnă întotdeauna o performanță biologică superioară, ci trebuie corelat cu activitatea metabolică celulară. Prin corelarea rezultatelor LDH cu cele obținute prin testul MTT, formularea 21-0.5 poate fi considerată cea mai favorabilă la nivel general. Deși această probă a prezentat valori LDH ușor crescute față de control, respectiv $1,09 \pm 0,08$ după 1 zi și $1,08 \pm 0,07$ după 5 zile, aceste creșteri au fost moderate și nu indică o citotoxicitate majoră. În același timp, proba 21-0.5 a prezentat cele mai bune rezultate MTT după 1 zi și 5 zile, cu viabilități de $99,12 \pm 0,12\%$ și $102,59 \pm 3,14\%$. Prin urmare, această formulare oferă cel mai bun echilibru între menținerea

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

activității metabolice și păstrarea integrității membranei celulare. În concluzie, rezultatele testului LDH confirmă faptul că suporturile funcționale investigate prezintă un profil de biocompatibilitate favorabil față de celulele MC3T3-E1, fără inducerea unei citotoxicități acute sau cumulative evidente. Din perspectiva exclusivă a eliberării LDH, probele 11-1 și 21-1 au avut cele mai reduse valori, însă prin integrarea rezultatelor MTT și LDH, proba 21-0.5 poate fi considerată cea mai bună formulare. Aceasta combină raportul alginat/κ-caragenan 2:1 cu 0,5% spirulină și prezintă cel mai echilibrat profil biologic, susținând activitatea metabolică celulară fără a produce o afectare importantă a membranei celulare.

II.2.4. Concluzii

Rezultatele obținute prin testele MTT și LDH au evidențiat faptul că răspunsul celulelor MC3T3-E1 a fost influențat direct de compoziția suporturilor funcționale, în special de raportul alginat/κ-caragenan și de concentrația de spirulină inclusă în matricea polizaharidică. Testul MTT a arătat că probele care conțin spirulină au susținut mai eficient activitatea metabolică celulară comparativ cu probele fără spirulină, mai ales după 5 zile de incubare. În schimb, probele 11 și 21, fără spirulină, au prezentat o scădere importantă a viabilității celulare în timp, ajungând la aproximativ 40% după 5 zile, ceea ce indică o capacitate limitată de susținere a celulelor MC3T3-E1 pe termen mai lung. Dintre formulările analizate prin MTT, proba 21-0.5 a prezentat cel mai favorabil comportament general. Aceasta a avut o viabilitate celulară de $99,12 \pm 0,12\%$ după 1 zi, $80,03 \pm 0,27\%$ după 2 zile și $102,59 \pm 3,14\%$ după 5 zile. Aceste valori indică faptul că raportul alginat/κ-caragenan 2:1, combinat cu 0,5% spirulină, susține eficient activitatea metabolică a celulelor MC3T3-E1 și permite menținerea unui răspuns celular favorabil pe durata perioadei investigate. Deși proba 21-1 a prezentat cea mai ridicată viabilitate după 2 zile, respectiv $102,04 \pm 0,97\%$, proba 21-0.5 a avut cel mai bun profil global, deoarece a prezentat rezultate superioare după 1 și 5 zile.

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 testului LDH au confirmat faptul că suporturile investigate nu au indus o citotoxicitate majoră asupra celulelor MC3T3-E1. Valorile LDH au rămas, în general, apropiate de controlul negativ pentru toate probele și pentru toate intervalele analizate, ceea ce sugerează menținerea integrității membranei celulare. Din perspectiva exclusivă a eliberării LDH, probele 11-1 și 21-1 au prezentat valori ușor mai reduse la unele intervale, indicând o eliberare mai mică de lactat-dehidrogenază. Totuși, aceste rezultate trebuie interpretate împreună cu datele MTT, deoarece un nivel redus de LDH nu reflectă neapărat o activitate metabolică ridicată. Prin corelarea rezultatelor MTT și LDH, proba 21-0.5 poate fi considerată formularea optimă. Aceasta a prezentat cea mai bună activitate metabolică globală și un nivel de LDH doar ușor crescut față de controlul negativ, fără indicii de citotoxicitate severă. Astfel, formularea bazată pe raport alginat/κ-caragenan 2:1 și 0,5% spirulină oferă cel mai bun echilibru între susținerea viabilității celulare și menținerea integrității membranei celulare.

În concluzie, includerea spirulinei în suporturile pe bază de alginat și κ-caragenan a îmbunătățit semnificativ răspunsul biologic al celulelor MC3T3-E1. Probele fără spirulină au prezentat o reducere progresivă a activității metabolice, în timp ce probele cu spirulină au susținut mai bine viabilitatea celulară. Dintre toate compozițiile investigate, 21-0.5 reprezintă cea mai promițătoare formulare, având un profil de biocompatibilitate favorabil și potențial pentru utilizare ca suport funcțional în aplicații biomedicale.

II.2.5. Bibliografie

[1] Mallamaci, R., Storelli, M. M., Barbarossa, A., Messina, G., Valenzano, A., & Meleleo, D. (2023). Potential Protective Effects of Spirulina (Spirulina platensis) against In Vitro Toxicity Induced by Heavy Metals (Cadmium, Mercury, and Lead) on SH-SY5Y Neuroblastoma Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(23), 17076. <https://doi.org/10.3390/ijms242317076>.

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

[2] Kim, S. E., Choi, S., Hong, J. Y., Shim, K. S., Kim, T. H., Park, K., & Lee, S. H. (2019). Accelerated Osteogenic Differentiation of MC3T3-E1 Cells by Lactoferrin-Conjugated Nanodiamonds through Enhanced Anti-Oxidant and Anti-Inflammatory Effects. *Nanomaterials*, 10(1), 50. <https://doi.org/10.3390/nano10010050>.

[3] Zhijie, Huan & Chu, Henry & Liu, Hongbo & Yang, Jie & Sun, Dong. (2017). Engineered bone scaffolds with Dielectrophoresis-based patterning using 3D printing. *Biomedical Microdevices*. 19. 10.1007/s10544-017-0245-5.

[4] Janmohammadi, M., Nourbakhsh, M. S., Bahraminasab, M., & Tayebi, L. (2023). Enhancing bone tissue engineering with 3D-Printed polycaprolactone scaffolds integrated with tragacanth gum/bioactive glass. *Materials Today Bio*, 23, 100872. <https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2023.100872>.

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 III

III.1. Capitolul 1

III.1. Analiza SEM a probelor pe bază de gelatină, K-caragenan, CNFs și COOH-GO post-implantare

Activitatea 3. Validarea in vivo a eficienței dispozitivelor REOSTEOMi

Subactivitatea 3.1. Validarea substituenților osoși în modele de șoarece.

Subactivitatea 3.4. Controlul funcțional și de calitate al componentelor Activității 3.

III.1.1. Introducere

Microscopia electronică de baleiaj (SEM) reprezintă o tehnică esențială pentru analiza morfologiei de suprafață și a arhitecturii interne a biomaterialelor poroase utilizate în ingineria tisulară. Metoda permite obținerea unor imagini cu rezoluție ridicată, prin detectarea electronilor generați în urma interacțiunii fasciculului electronic cu suprafața probei. Astfel, SEM oferă informații detaliate privind topografia materialului, dimensiunea și distribuția porilor, gradul de interconectivitate, rugozitatea suprafeței și eventualele modificări structurale apărute după expunerea la mediul biologic[1]. În domeniul biomaterialelor pentru regenerare osoasă, analiza SEM este utilizată frecvent pentru evaluarea scaffoldurilor înainte și după implantare, deoarece permite observarea modificărilor induse de contactul cu țesutul gazdă [2]. În cazul probelor post-implantare, această metodă poate evidenția procese precum degradarea parțială a matricei, remodelarea structurii poroase, depunerea de material biologic la suprafață și posibila integrare tisulară. Aceste aspecte sunt importante pentru aprecierea comportamentului materialului în condiții *in vivo* și pentru corelarea structurii scaffoldului cu răspunsul biologic observat [3]. În cadrul prezentei lucrări, analiza SEM a fost utilizată pentru evaluarea probelor post-implantare pe bază de gelatină, κ-carragenan, nanofibre de celuloză și oxid de grafenă funcționalizat cu grupări carboxil [4]. Unele probe au fost incubate cu BMP,

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

iar altele au fost tratate cu BMP în prezența sistemului EDC/NHS, pentru favorizarea legării covalente a factorului osteoinductiv la matricea polimerică. Probele au fost implantate în modele murine, incluzând animale de sex masculin și feminin, iar explantarea a fost realizată după 8 și 12 săptămâni. Prin analiza SEM s-a urmărit observarea modificărilor morfologice apărute după perioada de implantare, cu accent pe stabilitatea structurală a scaffoldurilor, menținerea porozității, interacțiunea cu țesutul gazdă și diferențele dintre probele funcționalizate prin adsorbție fizică a BMP și cele cu BMP legat covalent prin EDC/NHS. Această evaluare a permis aprecierea comportamentului scaffoldurilor în mediu biologic și a oferit informații relevante privind potențialul lor de utilizare în aplicații de regenerare osoasă.

III.1.2. Materiale și metode

III.1.2.1. Materiale

Gelatină obținută din piele de pește, k-caragenan, COOH-GO, clorura de calciu și genipin au fost achiziționate de la Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, SUA). Nanofibrele de celuloză au fost achiziționate de la Novarials (USA). Formulările obținute pentru dezvoltarea scaffoldurilor au fost concepute pe baza unei matrice polimerice naturale, codificate cu denumirea GCK, GCK-CG, care reflectă compoziția de bază utilizată: G-gelatină, K-carragenan, C-nanofibre de celuloză (CNF) și COOH-GO (CG).

Pe probele post-implantare în șoareci s-a realizat analiza morfologică prin microscopie electronică de baleiaj (SEM), pentru evaluarea structurii scaffoldurilor după contactul cu mediul biologic in vivo. Scaffoldurile au la bază 7 mL fază lichidă de nanofibre de celuloză 1%, 2 g gelatină, 0,4 g κ-carragenan, genipin 0,5% și concentrații variabile de COOH-GO, a prezentat cele mai bune caracteristici pentru etapele ulterioare de implantare. Ca și proces componentele au fost adăugate treptat în apă, sub agitare continuă, cu menținerea temperaturii la 40 °C, pentru a facilita solubilizarea gelatinei în mediul care conținea CNF-uri și pentru a evita degradarea matricei polimerice. După dizolvarea completă a gelatinei, κ-carragenanul 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

fost introdus la 50 °C, iar amestecul a fost menținut sub agitare intensă timp de 2 ore. Ulterior, soluțiile au fost omogenizate peste noapte, sub agitare redusă, pentru eliminarea bulelor de aer.

Tabelul 1 –Compoziția probelor implantate.

COD	Gelatină	Nanofibre de celuloză	K- carragenan	Clorură de calciu	Genipin	COOH- GO
Setul 5 GCK	6.66%	0.23%	1.33%	2%	0.5%	0
Setul 5 GCK-CG (0.125%)	6.66%	0.23%	1.33%	2%	0.5%	0.125%
Setul 5 GCK-CG (0.25%)	6.66%	0.23%	1.33%	2%	0.5%	0.25%
Setul 5 GCK-CG (0.5%)	6.66%	0.23%	1.33%	2%	0.5%	0.5%

În ziua următoare, în fiecare formulare au fost adăugați treptat câte 3 mL soluție de genipin, sub agitare controlată, pentru distribuirea uniformă a agentului de reticulare în masa materialului. Amestecarea a continuat timp de 10 minute, interval suficient pentru inițierea reticulării chimice între genipin și lanțurile polimerice ale gelatinei, fără apariția gelificării premature. Formulările obținute au fost turnate în plăci cu 96 de godeuri, pentru obținerea unor probe cu volum și geometrie reproductibile, adecvate implantării și evaluării in vivo. Reticularea ionică a fost realizată prin imersia probelor în soluție de clorură de calciu 2% timp

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 o oră, în vederea consolidării rețelei polimerice și creșterii stabilității structurale în medii apoase. După reticulare, probele au fost spălate de trei ori cu apă distilată, pentru îndepărtarea reziduurilor nelegate și a excesului de săruri. În etapa finală, scaffoldurile au fost înghețate și liofilizate, rezultând structuri poroase stabile, potrivite pentru manipulare, sterilizare, implantare. O parte dintre probele obținute au fost incubate cu BMP, în vederea funcționalizării scaffoldurilor cu un factor osteoinductiv relevant pentru stimularea proceselor de regenerare osoasă. În paralel, alte probe au fost tratate cu BMP în prezența sistemului de activare EDC/NHS, pentru favorizarea legării covalente a moleculelor de BMP la suprafața sau în structura matricei polimerice. Această abordare a permis compararea efectului BMP adsorbit fizic cu cel al BMP imobilizat covalent, în raport cu stabilitatea semnalului biologic și răspunsul tisular post-implantare. Ulterior, probele au fost implantate în modele murine, incluzând animale de sex masculin și feminin, iar evaluarea *in vivo* a fost realizată la intervale de 8 și 12 săptămâni. După explantare, scaffoldurile au fost analizate prin microscopie electronică de baleiaj (SEM), pentru investigarea modificărilor morfologice apărute în urma interacțiunii cu țesutul gazdă și pentru evidențierea gradului de integrare, degradare și remodelare structurală a materialelor implantate.

În acest experiment au fost utilizați șoareci din linia NOD.CB17Prkdcscid/J. Cazare șoarecilor s-a făcut în spații care au asigurat condițiile de microclimat necesare, respectiv 18-22°C și un ciclu de lumina de 12 ore lumina și 12 ore întuneric. Adăparea și hrănirea șoarecilor s-a realizat *ad libitum*, hrana și talașul utilizat la așternuturi fiind standardizat.

Animalele introduse în experiment au avut vârsta de aproximativ 2 luni și o masa corporală cuprinsă între 18 și 22 de grame. Fiecare lot a fost format din 10 animale, cu respectarea raportului de egalitate de sexe. Astfel au fost constituite zece loturi după cum urmează: un lot control și nouă loturi experimentale (Tabelul 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

Tabelul 2. Terminologia probelor implantat

Nr. Crt.	Lot	Material
1	C	Material control
2	V1	Material 0,125
3	V2	Material 0,250
4	V3	Material 0,500
5	V4	Material + BMP 0,125
6	V5	Material + BMP 0,250
7	V6	Material + BMP 0,500
8	V7	Material + BMP +edc 0,125 (legat covalent)
9	V8	Material + BMP +edc 0,250 (legat covalent)
10	V9	Material + BMP +edc 0,500 (legat covalent)

III.1.2.2. Metode

Caracterizarea morfologică a scaffoldurilor a fost realizată prin SEM, atât la nivelul suprafeței, cât și în secțiune. Înainte de analiză, probele au fost acoperite cu un strat de aur cu grosimea de aproximativ 6 nm utilizând echipamentul LUXOR Au/Pt Coating Equipment (IB-FT GmbH, Berlin, Germany), pentru a asigura conductivitatea electrică necesară examinării SEM.

Imaginile SEM au fost obținute utilizând microscopul Hitachi TM4000Plus II (Hitachi, Tokyo, Japan), controlat prin intermediul software-ului TM4000 (versiunea 1.5). Analizele au fost efectuate în modul de operare pentru probe conductoare, utilizând semnale de electroni retrodifuzati (Backscattered Electrons) și o tensiune de accelerare de 15 kV. Imaginile obținute

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

au fost utilizate pentru evaluarea calitativă a morfologiei, a distribuției porilor și a modificărilor structurale induse de variația compoziției scaffoldurilor.

III.1.3. Rezultate și discuții

Analiza SEM a probelor control post-implantare, prezentată în Figura 1, a evidențiat modificări morfologice ale scaffoldurilor după 8 și 12 săptămâni de contact cu mediul biologic. În cazul probei control explantate după 8 săptămâni, Figura 1(A), s-a observat o structură neregulată, cu suprafețe rugoase, fragmente lamelare și zone poroase distribuite neuniform. La magnificația de 60x, materialul a prezentat o arhitectură heterogenă, cu regiuni compacte alternate cu zone cu aspect fibrilar și poros. La magnificația de 100x, au fost evidențiate mai clar cavitățile și zonele fragmentate, sugerând inițierea proceselor de degradare și remodelare structurală după implantare.

După 12 săptămâni de implantare, Figura 1(B), morfologia probei control a indicat o reorganizare mai accentuată a structurii. Comparativ cu proba de la 8 săptămâni, s-au observat zone mai extinse de compactare, fragmente cu aspect exfoliat și regiuni poroase cu pereți subțiați. La magnificația de 60x, scaffoldul a păstrat parțial structura tridimensională, însă au fost vizibile zone de colaps local și fragmentare a matricei. La magnificația de 100x, suprafața a prezentat o textură mai pronunțată, cu pori interconectați, margini neregulate și depuneri fine la nivelul matricei, ceea ce poate fi asociat cu interacțiunea materialului cu țesutul gazdă și cu procesele de degradare in vivo. În ansamblu, probele control prezentate în Figura 1 au păstrat o arhitectură poroasă după implantare, fără pierderea completă a integrității structurale. Diferențele dintre cele două momente de explantare sugerează o evoluție progresivă a remodelării materialului, mai evidentă după 12 săptămâni. Aceste observații confirmă rolul probelor control ca reper morfologic pentru compararea cu variantele funcționalizate cu BMP și cu BMP legat covalent prin sistemul EDC/NHS.

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

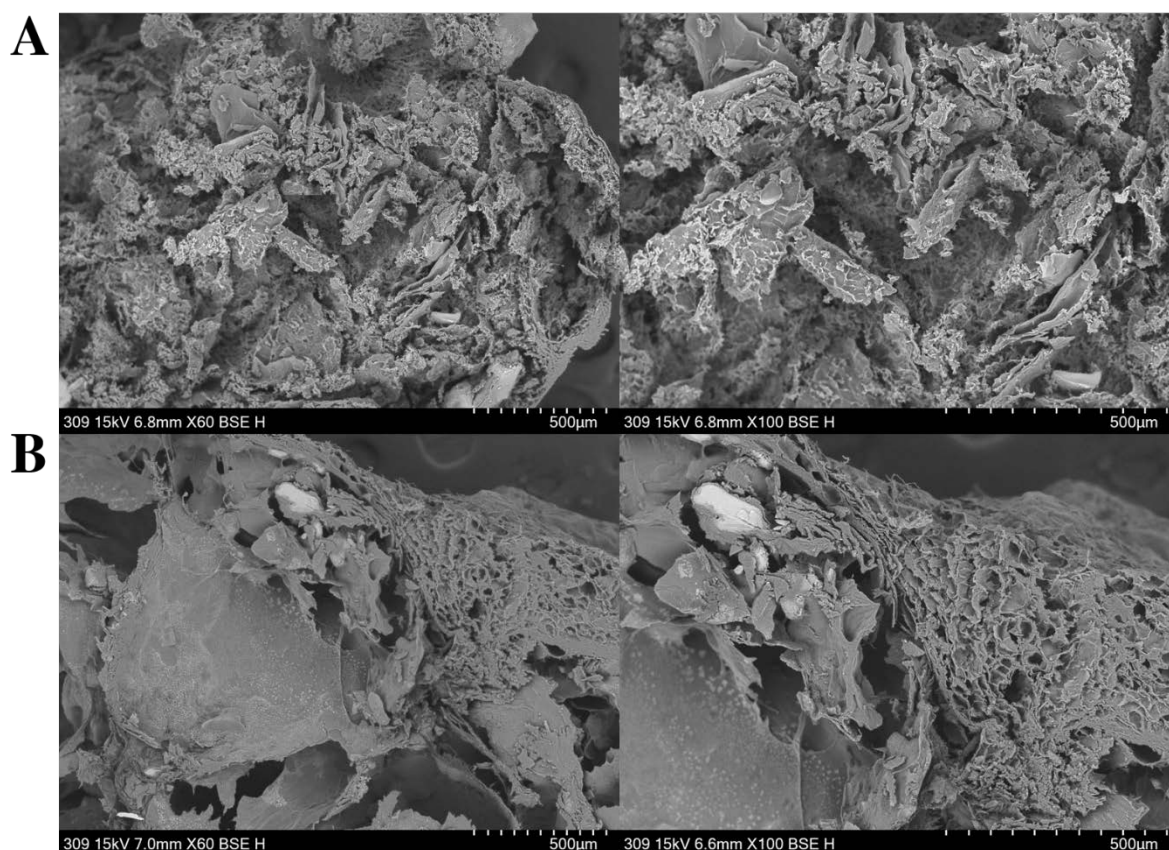


Figura 1. Micrografii SEM ale probelor control post-implantare pe bază de gelatină, κ -carragenan, CNFs și COOH-GO: (A) proba control după 8 săptămâni de implantare, la magnificații de 60x și 100x; (B) proba control după 12 săptămâni de implantare, la magnificații de 60x și 100x.

Analiza SEM a probei V1, prezentată în Figura 2, a evidențiat morfologia materialului pe bază de gelatină, κ -carragenan, CNFs și 0,125% COOH-GO după implantare. Această probă nu a fost funcționalizată cu BMP și nu a fost tratată cu EDC/NHS, fiind utilizată pentru evaluarea efectului concentrației reduse de COOH-GO asupra comportamentului scaffoldului în condiții in vivo. După 8 săptămâni de implantare, Figura 2(A), proba V1 a prezentat o structură heterogenă, cu zone poroase bine evidențiate, fragmente lamelare și regiuni compacte

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

distribuite neuniform. La magnificația de 60x, s-a observat o rețea poroasă vizibilă la periferia materialului, cu pori de dimensiuni variabile și pereți subțiri, ceea ce indică menținerea parțială a arhitecturii tridimensionale a scaffoldului. La magnificația de 100x, Figura 2(A), suprafața a prezentat zone rugoase, fragmente exfoliate și regiuni cu aspect compact, sugerând apariția unor procese locale de degradare și remodelare structurală după contactul cu mediul biologic.

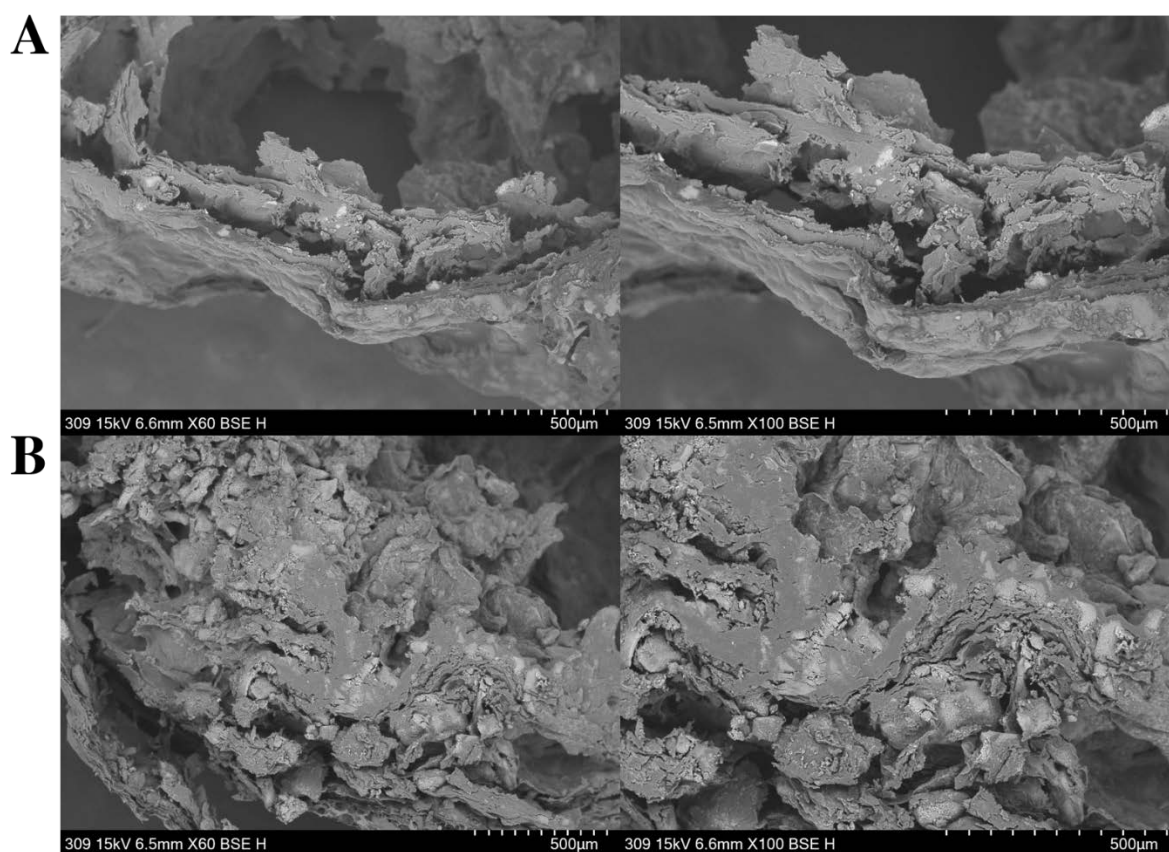


Figura 2. Micrografii SEM ale probei V1 post-implantare, material 0,125 pe bază de gelatină, κ-carragenan, CNFs și COOH-GO: (A) după 8 săptămâni de implantare, la magnificații de 60x și 100x; (B) după 12 săptămâni de implantare, la magnificații de 60x și 100x.

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

La 12 săptămâni de la implantare, Figura 2(B), morfologia probei V1 a devenit mai compactă și mai fragmentată comparativ cu aspectul observat la 8 săptămâni. La magnificația de 60x, au fost vizibile aglomerări neregulate ale matricei, cu pierderea parțială a continuității structurale și cu reducerea zonelor poroase deschise. La magnificația de 100x, Figura 2(B), au fost observate depuneri granulare și formațiuni cu aspect mineralizat la suprafața scaffoldului. Aceste structuri pot fi asociate cu depuneri anorganice apărute în urma interacțiunii materialului cu mediul tisular, posibil favorizate de prezența COOH-GO, care poate contribui la creșterea rugozității suprafeței și la oferirea unor situsuri active pentru interacțiuni cu componentele biologice. Comparativ cu proba control, proba V1 a prezentat o structură mai densă și o fragmentare mai accentuată după 12 săptămâni, dar și indicii morfologice compatibile cu apariția unor depuneri minerale la nivelul matricei. Acest comportament sugerează că introducerea unei concentrații reduse de COOH-GO, respectiv 0,125%, a influențat interacțiunea scaffoldului cu mediul biologic, fără a compromite complet integritatea structurală a materialului. Confirmarea naturii minerale a depunerilor observate necesită însă analize complementare, precum EDS, FTIR sau Raman.

Analiza SEM a probei V2, prezentată în Figura 3, a evidențiat morfologia materialului pe bază de gelatină, κ-carragenan, CNFs și 0,250% COOH-GO după implantare. Conform terminologiei probelor, V2 reprezintă scaffoldul cu o concentrație intermediară de COOH-GO, fără BMP și fără activare EDC/NHS, ceea ce permite evaluarea influenței oxidului de grafenă carboxilat asupra comportamentului materialului în condiții in vivo. După 8 săptămâni de implantare, Figura 3(A), proba V2 a prezentat o arhitectură heterogenă, cu zone poroase încă bine vizibile, regiuni lamelare și fragmente ale matricei polimerice dispuse neregulat. La magnificația de 60x, s-a observat menținerea parțială a unei structuri tridimensionale deschise, cu pori de dimensiuni variabile și pereți subțiri. La magnificația de 100x, Figura 3(A), suprafața scaffoldului a prezentat rugozitate accentuată, fragmente exfoliate și zone cu aspect fibrilar,

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

sugerând procese locale de degradare și remodelare structurală după interacțiunea cu mediul biologic.

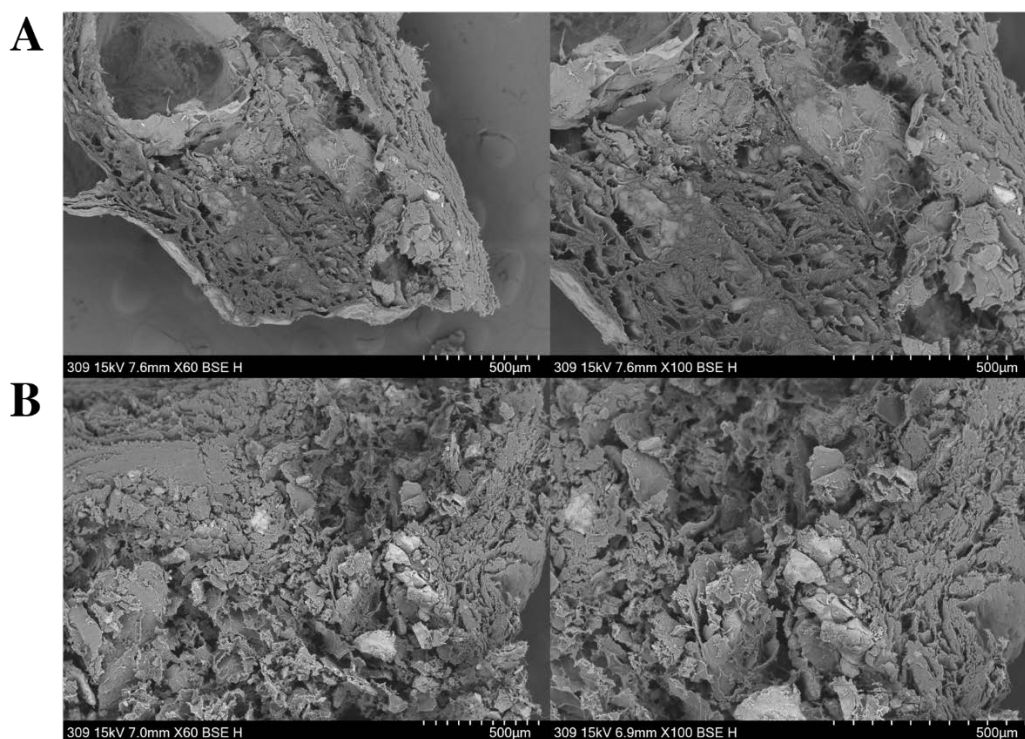


Figura 3. Micrografii SEM ale probei V2 post-implantare, reprezentând materialul pe bază de gelatină, κ -carragenan, CNFs și 0,250% COOH-GO: (A) după 8 săptămâni de implantare, la magnificații de 60x și 100x; (B) după 12 săptămâni de implantare, la magnificații de 60x și 100x.

După 12 săptămâni de implantare, Figura 3(B), morfologia probei V2 a devenit mai fragmentată și mai compactă, cu aglomerări neregulate ale materialului și reducerea parțială a porozității deschise. La magnificația de 60x, au fost observate zone cu aspect granular și fragmente compacte distribuite în interiorul matricei. La magnificația de 100x, Figura 3(B), au fost evidențiate formațiuni particulare cu aspect mineralizat, vizibile sub forma unor depuneri dense, cu contrast mai ridicat față de matricea polimerică. Aceste structuri pot indica acumulări

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

anorganice sau depuneri minerale formate în timpul implantării, posibil asociate cu interacțiunea dintre grupările carboxil ale COOH-GO și componentele ionice sau biologice ale mediului tisular. Comparativ cu proba V1, care conține 0,125% COOH-GO, proba V2 pare să prezinte o suprafață mai compactă și depuneri mai evidente după 12 săptămâni, ceea ce poate sugera o interacțiune mai intensă a scaffoldului cu mediul biologic. Totuși, natura exactă a acestor depuneri nu poate fi stabilită exclusiv prin SEM, fiind necesare analize complementare, precum EDS, FTIR sau Raman. În ansamblu, imaginile SEM din Figura 3 indică faptul că proba V2 și-a menținut parțial integritatea structurală după implantare, dar a suferit procese progresive de remodelare, fragmentare și posibilă mineralizare, mai evidente la 12 săptămâni.

Figura 4 prezintă morfologia probei V3, corespunzătoare scaffoldului pe bază de gelatină, κ -carragenan, CNFs și 0,500% COOH-GO, fără BMP și fără tratament EDC/NHS. Analiza SEM a evidențiat o structură heterogenă, alcătuită din regiuni lamelare, zone poroase și fragmente compacte, ceea ce indică menținerea parțială a arhitecturii scaffoldului după implantare. Pentru proba explantată după 8 săptămâni, Figura 4(A), la magnificația de 60x s-a observat o morfologie relativ compactă, cu alternanță între zone dense și cavități de dimensiuni mari, delimitate de pereți lamelari. La magnificația de 100x, Figura 4(A), au fost evidențiate mai clar straturile suprapuse ale matricei, suprafața rugoasă și mai multe formațiuni cu contrast ridicat, distribuite în interiorul scaffoldului. Acestea pot sugera prezența unor depuneri particulare, posibil de natură minerală, însă compoziția lor nu poate fi confirmată exclusiv prin SEM. După 12 săptămâni de implantare, Figura 4(B), proba V3 a prezentat o structură mai deschisă, cu porozitate mai evidentă și fragmente lamelare neregulate. La magnificația de 60x s-au observat cavități mai largi și o organizare mai puțin compactă a materialului comparativ cu proba de la 8 săptămâni. La magnificația de 100x, Figura 4(B), suprafața a păstrat un aspect rugos și exfoliat, iar în anumite regiuni au rămas vizibile aglomerări și particule cu aspect granular, compatibile cu depuneri formate în urma interacțiunii materialului cu mediul biologic. În concluzie, Figura 4 sugerează că proba V3 și-a păstrat parțial integritatea

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 pe durata implantării, dar a suferit procese de remodelare și reorganizare morfologică. Prezența concentrației de 0,500% COOH-GO pare să fie asociată cu o morfologie mai lamelară și cu apariția unor depuneri mai evidente în matrice, posibil favorizând interacțiunea cu componentele mediului tisular. Pentru confirmarea naturii acestor depuneri, ar fi necesare analize complementare, precum EDS sau FTIR.

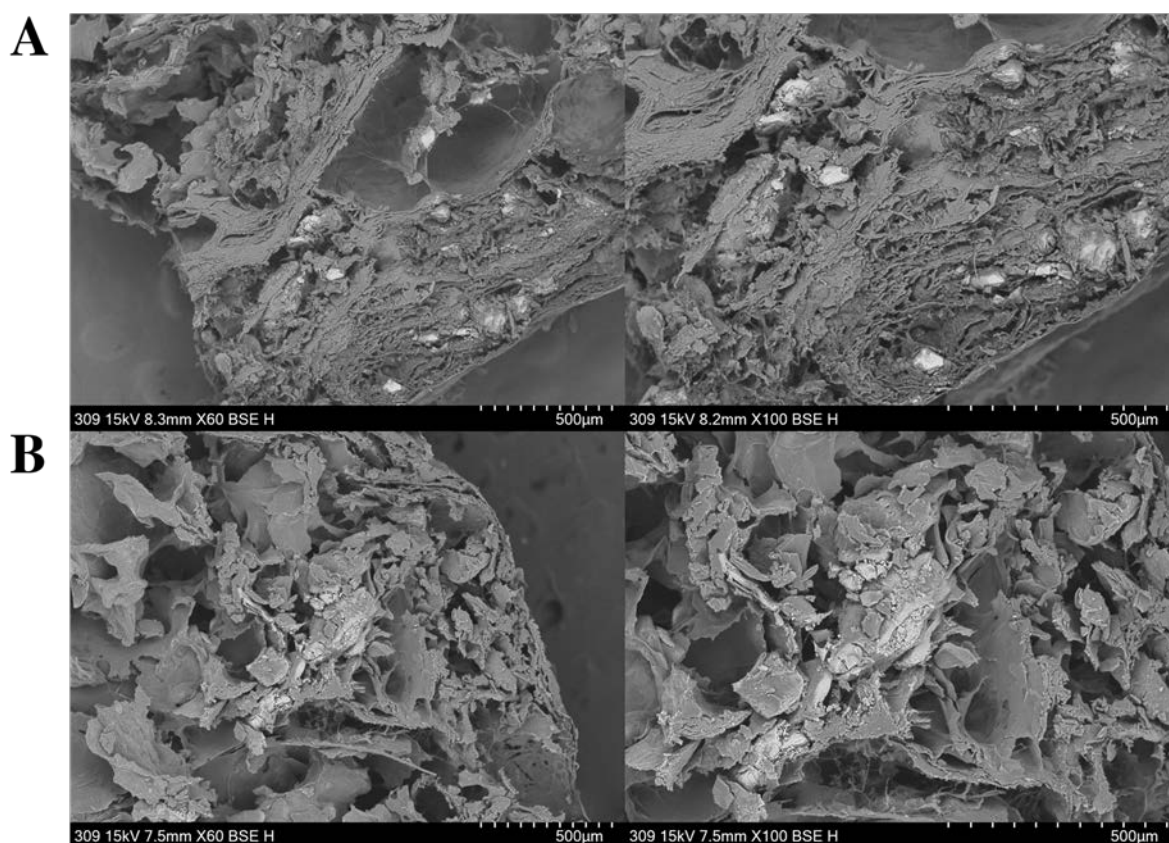


Figura 4. Micrografii SEM ale probei V3 post-implantare, reprezentând materialul pe bază de gelatină, κ -carragenan, CNFs și 0,500% COOH-GO: (A) după 8 săptămâni de implantare, la magnificații de 60x și 100x; (B) după 12 săptămâni de implantare, la magnificații de 60x și 100x.

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 Figura 5 este prezentată morfologia probei V4, corespunzătoare scaffoldului pe bază de gelatină, κ -carragenan, CNFs și 0,125% COOH-GO, incubat cu BMP. Analiza SEM a evidențiat o structură lamelară și relativ compactă, în care sunt prezente atât zone dense, cât și cavități și regiuni cu aspect exfoliat, ceea ce indică remodelarea progresivă a materialului după implantare.

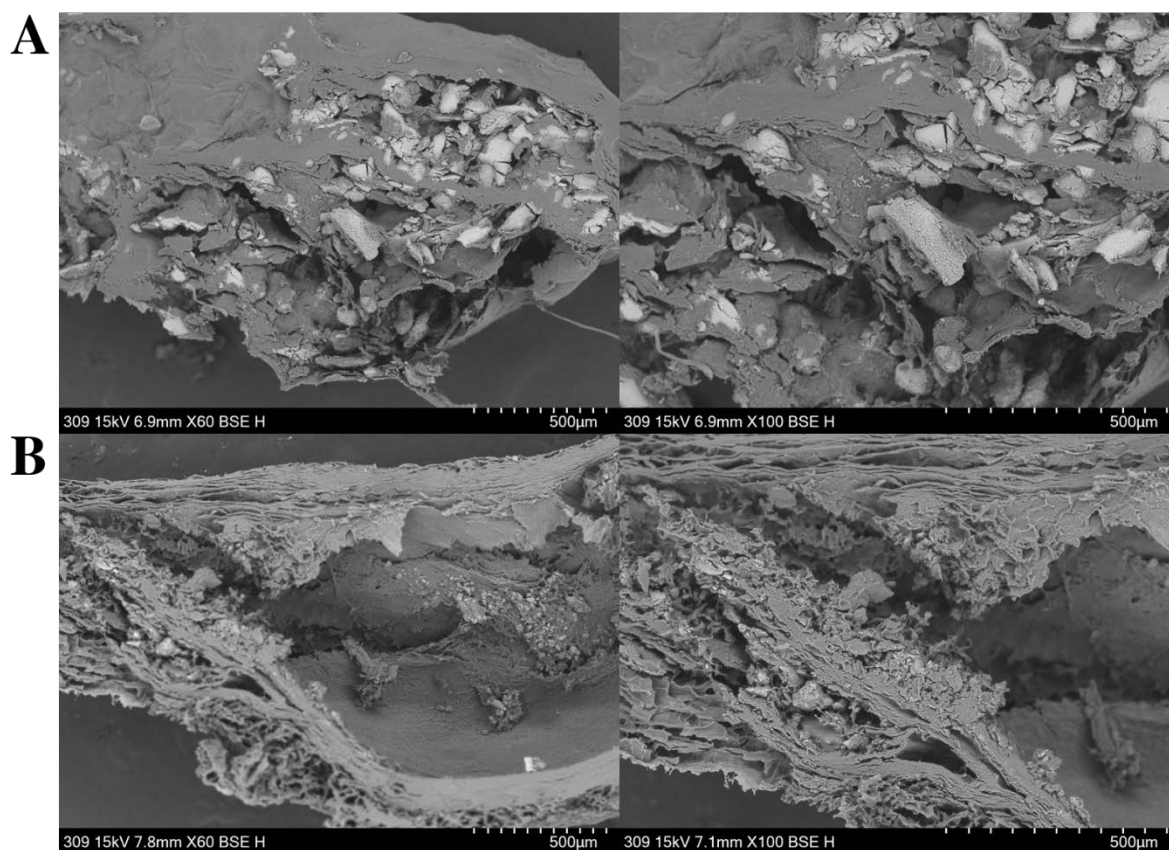


Figura 5. Micrografii SEM ale probei V4 post-implantare, reprezentând materialul pe bază de gelatină, κ -carragenan, CNFs și 0,125% COOH-GO, funcționalizat cu BMP: (A) după 8 săptămâni de implantare, la magnificații de 60x și 100x; (B) după 12 săptămâni de implantare, la magnificații de 60x și 100x.

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

Proba explantată după 8 săptămâni, Figura 5(A), la magnificația de 60x s-a observat o matrice relativ compactă, cu straturi suprapuse și multiple aglomerări cu contrast ridicat distribuite în interiorul scaffoldului. La magnificația de 100x, Figura 5(A), aceste formațiuni au devenit mai evidente, având aspect granular sau particulat, localizat între lamelele matricei. Prezența acestor depuneri poate sugera acumulări de natură anorganică sau începutul unor procese de mineralizare, posibil favorizate de prezența BMP, însă compoziția lor nu poate fi stabilită exclusiv pe baza imaginilor SEM. După 12 săptămâni de implantare, Figura 5(B), proba V4 a prezentat o reorganizare morfologică mai accentuată.

La magnificația de 60x s-a observat o structură în continuare lamelară, cu cavități mai largi și cu zone în care matricea pare parțial subțiată sau delaminată. La magnificația de 100x, Figura 5(B), suprafața a păstrat un aspect rugos și stratificat, iar depunerile particulare au rămas prezente, deși par mai fin distribuite și integrate în matricea scaffoldului. Acest aspect poate indica evoluția interacțiunii dintre material și mediul tisular pe parcursul perioadei de implantare. Comparativ cu probele fără BMP, proba V4 din Figura 5 pare să prezinte depuneri mai evidente și o organizare mai clară a zonelor lamelare, ceea ce poate sugera un răspuns local diferit indus de funcționalizarea cu BMP. Per total, scaffoldul și-a menținut parțial integritatea structurală după 8 și 12 săptămâni, dar a suferit procese de remodelare, compactare locală și posibilă mineralizare. Confirmarea naturii depunerilor observate necesită analize complementare, precum EDS, FTIR sau Raman.

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

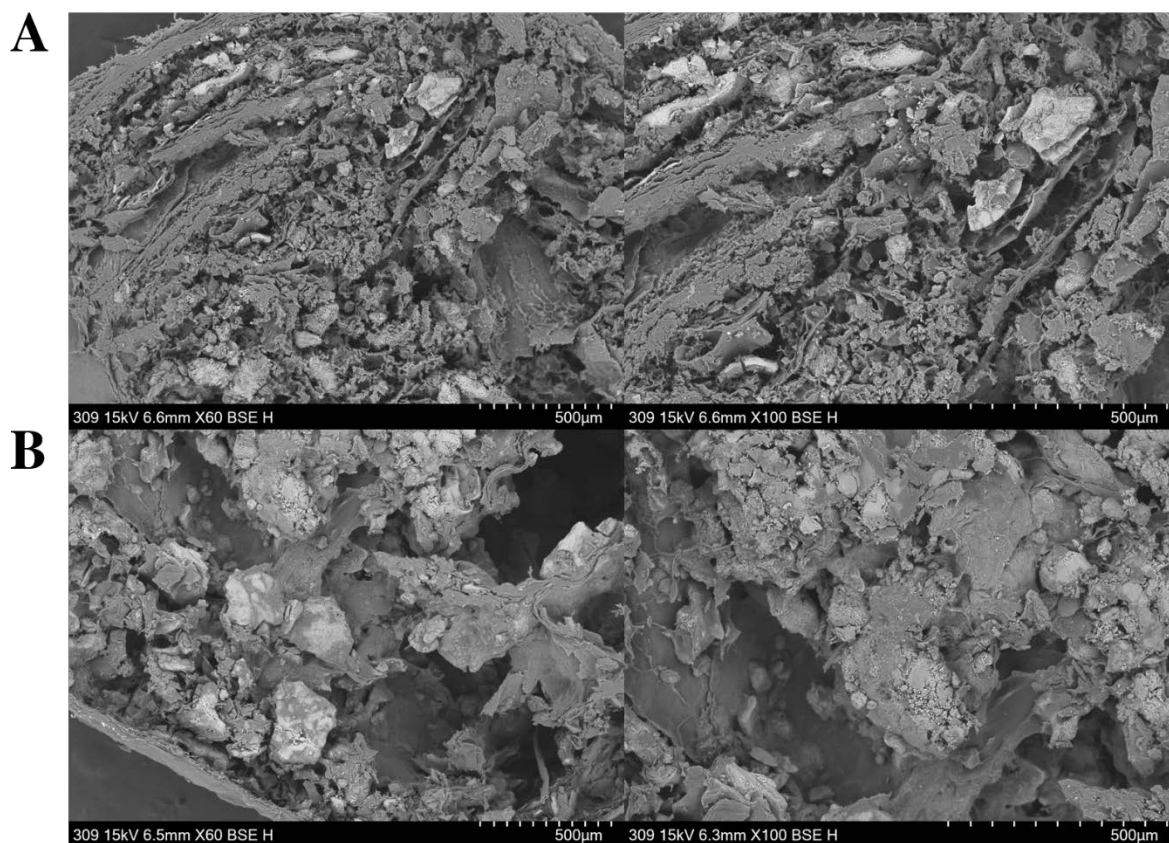


Figura 6. Micrografii SEM ale probei V5 post-implantare, reprezentând materialul pe bază de gelatină, κ -carragenan, CNFs și 0,250% COOH-GO, funcționalizat cu BMP: (A) după 8 săptămâni de implantare, la magnificații de 60x și 100x; (B) după 12 săptămâni de implantare, la magnificații de 60x și 100x.

Figura 6 prezintă morfologia probei V5, corespunzătoare scaffoldului pe bază de gelatină, κ -carragenan, CNFs și 0,250% COOH-GO, incubat cu BMP. Analiza SEM a evidențiat o structură marcat heterogenă, alcătuită din fragmente lamelare, regiuni compacte și numeroase depuneri cu contrast ridicat, distribuite în masa materialului, ceea ce sugerează o

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

interacțiuni accentuată cu mediul biologic după implantare. Pentru proba explantată după 8 săptămâni, Figura 6(A), la magnificația de 60x s-a observat o matrice relativ densă, cu zone stratificate și aglomerări particulare dispuse între fragmentele scaffoldului. La magnificația de 100x, Figura 6(A), aceste formațiuni au fost mai clar evidențiate, având aspect granular, neregulat și contrast mai ridicat decât matricea polimerică din jur. Prezența lor poate sugera depuneri de natură anorganică sau începutul unor procese de mineralizare, posibil favorizate de efectul osteoinductiv al BMP. După 12 săptămâni de implantare, Figura 6(B), proba V5 a prezentat o reorganizare mai accentuată a structurii, cu fragmentarea suplimentară a matricei și persistența unor aglomerări dense în interiorul scaffoldului. La magnificația de 60x s-au observat cavități neregulate și zone compacte între care sunt prezente formațiuni masive, cu aspect de conglomerate. La magnificația de 100x, Figura 6(B), aceste depuneri au rămas evidente, fiind asociate cu suprafețe rugoase, margini neregulate și regiuni poroase parțial colabate. Aspectul general sugerează că, pe parcursul perioadei de implantare, materialul a suferit atât procese de remodelare și degradare, cât și posibile fenomene de acumulare minerală. În concluzie, probele V5 prezentate în Figura 6 par să evidențieze depuneri mai numeroase și mai pronunțate decât variantele fără BMP, ceea ce poate indica un răspuns local diferit indus de funcționalizarea cu BMP, în prezența unei concentrații de 0,250% COOH-GO. Scaffoldul și-a păstrat parțial arhitectura după implantare, însă a prezentat o fragmentare progresivă și un aspect compatibil cu posibile procese de mineralizare. Pentru confirmarea naturii acestor depuneri sunt necesare analize complementare, precum EDS, FTIR sau Raman.

În Figura 7 este prezentată morfologia probei V6, corespunzătoare scaffoldului pe bază de gelatină, κ -carragenan, CNFs și 0,500% COOH-GO, funcționalizat cu BMP. Analiza SEM a evidențiat o structură heterogenă, cu zone lamelare, regiuni compacte și pori de dimensiuni variabile, alături de formațiuni cu contrast mai ridicat, sugestive pentru depuneri particulare posibil asociate cu procese de mineralizare. În cazul probei explantate după 8 săptămâni, Figura 7(A), la magnificația de 60x s-a observat o matrice relativ compactă, cu alternanță între regiuni

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

dense și cavități delimitate de pereți stratificați. La magnificația de 100x, Figura 7(A), au devenit mai evidente multiple particule și aglomerări cu aspect granular, dispuse între lamelele matricei și în interiorul unor zone mai dense. Aceste structuri, caracterizate prin contrast mai ridicat față de matricea polimerică, pot sugera depuneri de natură anorganică sau zone de mineralizare incipientă.

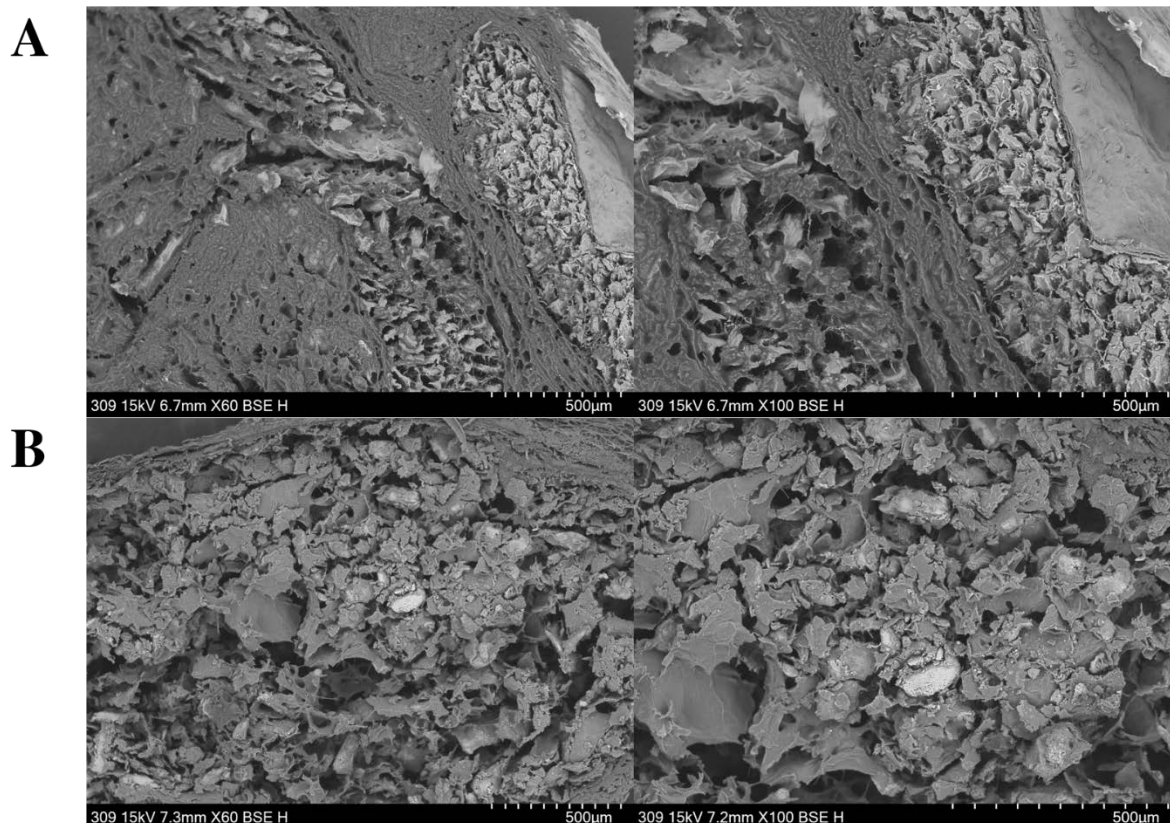


Figura 7. Micrografii SEM ale probei V6 post-implantare, reprezentând materialul pe bază de gelatină, κ -carragenan, CNFs și 0,500% COOH-GO, funcționalizat cu BMP: (A) după 8 săptămâni de implantare, la magnificații de 60x și 100x; (B) după 12 săptămâni de implantare, la magnificații de 60x și 100x.

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

După 12 săptămâni de implantare, Figura 7(B), proba V6 a prezentat o morfologie mai fragmentată, cu reorganizarea materialului în aglomerări neregulate și reducerea caracterului deschis al unor zone poroase. La magnificația de 60x s-au observat fragmente compacte și regiuni exfoliate, între care sunt prezente depuneri particulare mai evidente decât în varianta discutată anterior. La magnificația de 100x, Figura 7(B), aceste depuneri apar sub forma unor conglomerate granulare și a unor formațiuni dense distribuite în masa scaffoldului, ceea ce susține ipoteza existenței unor acumulări minerale sau a unor depozite formate în urma interacțiunii materialului cu mediul tisular.

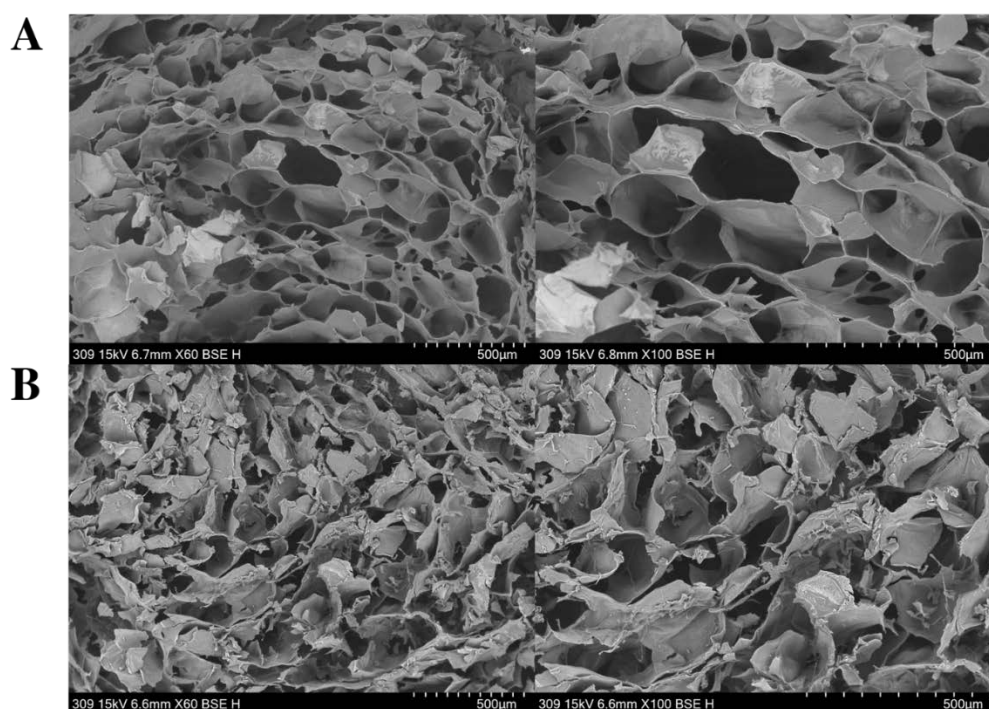


Figura 8. Micrografii SEM ale probei V7 post-implantare, reprezentând materialul pe bază de gelatină, κ -carragenan, CNFs și 0,125% COOH-GO, funcționalizat cu BMP legat covalent prin sistemul EDC/NHS: (A) după 8 săptămâni de implantare, la magnificații de 60x și 100x; (B) după 12 săptămâni de implantare, la magnificații de 60x și 100x.

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 concluzie, proba V6 prezentată în Figura 7 a păstrat parțial arhitectura scaffoldului după implantare, dar a evidențiat și procese de remodelare, fragmentare și apariția unor depuneri cu posibil caracter mineral. Comparativ cu interpretarea inițială, imaginile actuale sugerează mai clar prezența unor zone mineralizate, atât după 8 săptămâni, cât și după 12 săptămâni, chiar dacă acestea nu par uniform distribuite în întreaga matrice. Confirmarea naturii acestor depuneri necesită, totuși, analize complementare, precum EDS, FTIR sau Raman.

În Figura 8 este prezentată morfologia probei V7, corespunzătoare scaffoldului pe bază de gelatină, κ -carragenan, CNFs și 0,125% COOH-GO, funcționalizat cu BMP legat covalent prin sistemul EDC/NHS. Analiza SEM a evidențiat o structură predominant poroasă, cu pereți subțiri, cavități interconectate și fragmente lamelare distribuite relativ uniform, aspect ce sugerează menținerea arhitecturii tridimensionale a scaffoldului după implantare. În cazul probei explantate după 8 săptămâni, Figura 8(A), la magnificația de 60x s-a observat o rețea poroasă bine conturată, alcătuită din cavități de dimensiuni variabile, separate de pereți fini ai matricei. La magnificația de 100x, Figura 8(A), această arhitectură a devenit mai clară, fiind evidențiate suprafețe relativ netede, margini subțiri și zone slab exfoliate. În această probă nu se observă depuneri dense sau aglomerări granulare evidente, ceea ce sugerează absența unor procese pronunțate de mineralizare în aria analizată. La 12 săptămâni de la implantare, Figura 8(B), proba V7 a păstrat un aspect poros, însă cu o ușoară reorganizare a matricei și cu fragmente lamelare mai numeroase. La magnificația de 60x s-a observat o structură mai fragmentată comparativ cu proba de la 8 săptămâni, dar fără colaps evident al rețelei poroase. La magnificația de 100x, Figura 8(B), au fost vizibile pereți subțiați, margini neregulate și zone de remodelare locală, însă fără formațiuni cu contrast ridicat care să sugereze clar depuneri minerale. Aspectul general indică mai degrabă degradarea și reorganizarea progresivă a scaffoldului decât acumularea de material mineralizat. În final, proba V7 prezentată în Figura 8 a evidențiat o bună menținere a porozității și a arhitecturii interne după implantare, atât la 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

cât și la 12 săptămâni. Spre deosebire de unele probe funcționalizate cu BMP la care au fost observate depuneri particulare mai evidente, în cazul V7 nu se disting semne SEM clare de mineralizare. Acest rezultat sugerează că, pentru concentrația de 0,125% COOH-GO și în condițiile imobilizării covalente a BMP, răspunsul morfologic a fost dominat de păstrarea structurii poroase și de remodelarea matricei, mai degrabă decât de formarea unor depozite minerale evidente.

Figura 9 prezintă morfologia probei V8, corespunzătoare scaffoldului pe bază de gelatină, κ -carragenan, CNFs și 0,250% COOH-GO, funcționalizat cu BMP legat covalent prin sistemul EDC/NHS. Analiza SEM a evidențiat o arhitectură predominant poroasă, cu pereți subțiri, fragmente lamelare și cavități interconectate, fără depuneri minerale evidente în zonele analizate. După 8 săptămâni de implantare, Figura 9(A), proba V8 a prezentat o structură deschisă, cu pori de dimensiuni variabile și o distribuție relativ uniformă a cavităților. La magnificația de 60x s-a observat menținerea unei rețele poroase bine conturate, alcătuită din lamele subțiri și regiuni exfoliate ale matricei. La magnificația de 100x, Figura 9(A), suprafața scaffoldului a evidențiat margini neregulate, pereți fini și zone rugoase, însă fără aglomerări dense sau formațiuni cu contrast ridicat care să sugereze clar mineralizare. La 12 săptămâni de implantare, Figura 9(B), morfologia probei V8 a rămas predominant poroasă, dar a prezentat o fragmentare mai accentuată a matricei. La magnificația de 60x au fost observate cavități interconectate, fragmente lamelare și regiuni parțial colabate, indicând remodelarea progresivă a scaffoldului în mediul biologic. La magnificația de 100x, Figura 9(B), structura a fost caracterizată prin pereți subțiați, suprafețe rugoase și fragmente desprinse ale matricei, însă fără depozite minerale masive sau particule granulare evidente. Comparativ cu probele funcționalizate cu BMP prin adsorbție fizică, precum V4, V5 și V6, proba V8 nu prezintă în imaginile SEM depuneri minerale clare. Acest aspect poate sugera că, în cazul concentrației de 0,250% COOH-GO și al imobilizării covalente a BMP prin EDC/NHS, răspunsul morfologic a fost dominat de menținerea structurii poroase și de remodelarea matricei, mai degrabă decât

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 acumularea unor depozite minerale vizibile. Totuși, absența mineralizării nu poate fi confirmată definitiv doar prin SEM, fiind necesare analize complementare, precum EDS, FTIR sau Raman, pentru verificarea compoziției locale.

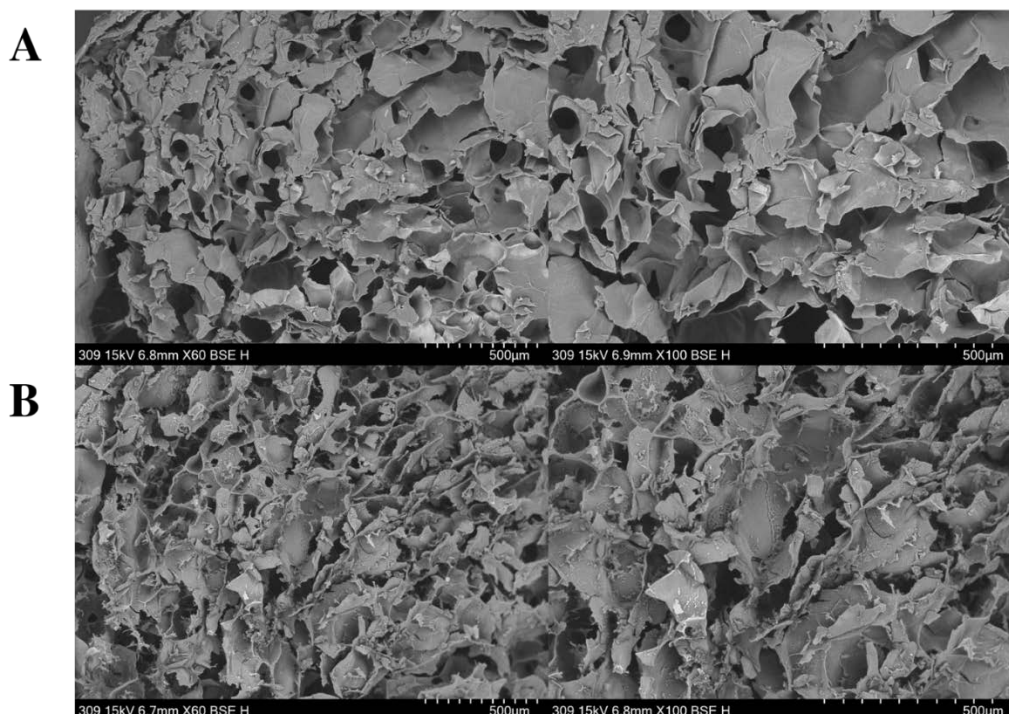


Figura 9. Micrografii SEM ale probei V8 post-implantare, reprezentând materialul pe bază de gelatină, κ -carragenan, CNFs și 0,250% COOH-GO, funcționalizat cu BMP legat covalent prin sistemul EDC/NHS: (A) după 8 săptămâni de implantare, la magnificații de 60x și 100x; (B) după 12 săptămâni de implantare, la magnificații de 60x și 100x.

În Figura 10 este prezentată morfologia probei V9, corespunzătoare scaffoldului pe bază de gelatină, κ -carragenan, CNFs și 0,500% COOH-GO, funcționalizat cu BMP legat covalent prin sistemul EDC/NHS. Analiza SEM a evidențiat o arhitectură predominant poroasă și lamelară, cu cavități largi, pereți subțiri și fragmente ale matricei dispuse neregulat. În zonele analizate nu se observă depuneri minerale evidente, aspectul fiind dominat de menținerea porozității și de remodelarea structurală a scaffoldului după implantare.

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

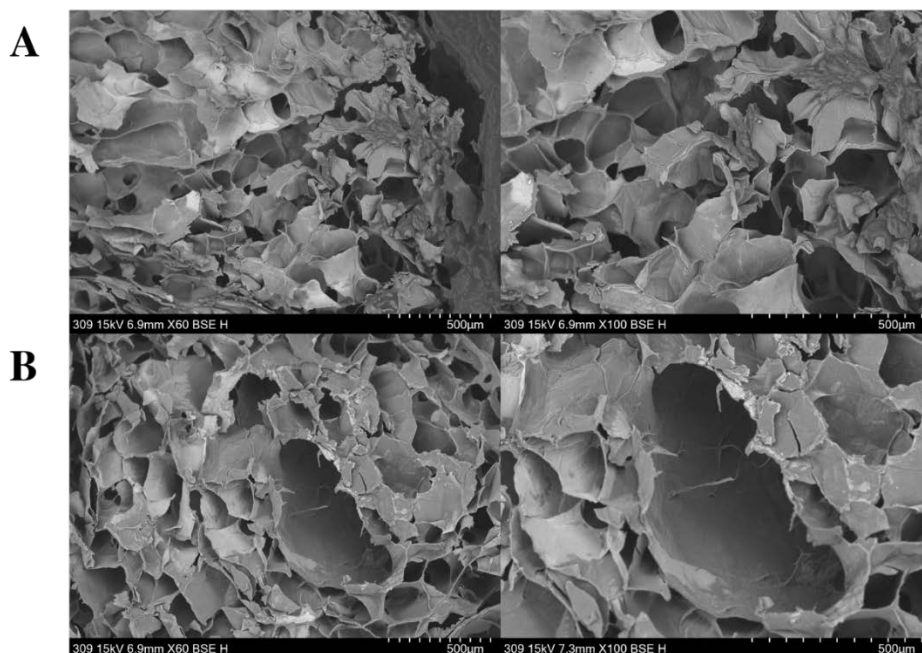


Figura 10. Micrografii SEM ale probei V9 post-implantare, reprezentând materialul pe bază de gelatină, κ -carragenan, CNFs și 0,500% COOH-GO, funcționalizat cu BMP legat covalent prin sistemul EDC/NHS: (A) după 8 săptămâni de implantare, la magnificații de 60x și 100x; (B) după 12 săptămâni de implantare, la magnificații de 60x și 100x.

După 8 săptămâni de implantare, Figura 10(A), la magnificația de 60x s-a observat o rețea poroasă bine conturată, alcătuită din cavități de dimensiuni variabile, delimitate de pereți lamelari subțiri. La magnificația de 100x, Figura 10(A), structura internă a materialului a devenit mai clară, fiind vizibile suprafețe relativ netede, fragmente exfoliate și margini neregulate. Comparativ cu probele V4, V5 și V6, în care au fost observate formațiuni granulare sau aglomerări cu posibil caracter mineral, în cazul V9 nu apar depozite dense sau particule cu contrast ridicat care să indice clar mineralizare. După 12 săptămâni de implantare, Figura 10(B), proba V9 a păstrat o morfologie poroasă, cu cavități largi și interconectate. La magnificația de 60x s-a observat o structură mai deschisă, cu pereți subțiați și fragmente

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

lamelare desprinse, ceea ce indică remodelarea progresivă a matricei în mediul biologic. La magnificația de 100x, Figura 10(B), se remarcă pori mari, suprafețe continue și zone exfoliate, însă fără acumulări minerale evidente la nivelul suprafeței analizate. În ansamblu, proba V9 prezentată în Figura 10 a evidențiat o bună menținere a arhitecturii poroase după implantare, atât la 8, cât și la 12 săptămâni. Absența unor depuneri minerale clare sugerează că, în cazul concentrației de 0,500% COOH-GO și al imobilizării covalente a BMP prin EDC/NHS, răspunsul morfologic observat prin SEM a fost dominat de conservarea porozității și de degradarea controlată a matricei, mai degrabă decât de formarea unor depozite mineralizate evidente. Totuși, natura chimică a suprafeței și absența mineralizării ar trebui confirmate prin analize complementare, precum EDS, FTIR sau Raman.

III.1.4. Concluzii și discuții

Analiza SEM a probelor post-implantare pe bază de gelatină, κ -carragenan, CNFs și COOH-GO a permis evaluarea modificărilor morfologice apărute după 8 și 12 săptămâni de implantare în model murin. Compararea probelor C și V1-V9 a evidențiat diferențe importante în ceea ce privește menținerea arhitecturii poroase, gradul de fragmentare a matricei, compactarea locală, aspectul lamelar al scaffoldurilor și prezența unor depuneri cu posibil caracter mineral. În ansamblu, toate probele au păstrat, în grade diferite, o structură tridimensională poroasă, indicând faptul că matricea polimerică reticulată a avut o stabilitate suficientă pentru a rezista mediului biologic pe durata implantării. Proba control, a prezentat o morfologie neregulată, cu zone poroase, fragmente lamelare și regiuni compacte, fiind utilizată ca reper pentru evaluarea efectului introducerii COOH-GO și al funcționalizării cu BMP. După 8 săptămâni, structura probei control a fost caracterizată printr-o porozitate parțial menținută și prin zone de degradare locală, în timp ce după 12 săptămâni s-a observat o fragmentare mai accentuată și o reorganizare mai evidentă a matricei. Acest comportament indică o remodelare progresivă a scaffoldului în mediul biologic, fără colaps complet al structurii.

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 probelor V1, V2 și V3, care conțin COOH-GO în concentrații de 0,125%, 0,250% și 0,500%, fără BMP, imaginile SEM au arătat că introducerea oxidului de grafenă carboxilat a influențat morfologia post-implantare a scaffoldurilor. Proba V1, , a prezentat o structură heterogenă, cu zone poroase și fragmente compacte, iar după 12 săptămâni au fost observate depuneri granulare cu posibil caracter mineral. Acest aspect poate sugera că o concentrație redusă de COOH-GO a favorizat interacțiunea cu mediul tisular, probabil prin creșterea rugozității suprafeței și prin prezența grupărilor carboxil disponibile pentru interacțiuni cu ioni sau componente biologice.

Proba V2, corespunzătoare materialului cu 0,250% COOH-GO, a prezentat o morfologie mai compactă și o fragmentare mai accentuată după 12 săptămâni, comparativ cu V1. În această probă au fost observate formațiuni particulare cu contrast ridicat, compatibile cu depuneri anorganice sau cu zone de mineralizare locală. Prin comparație, proba V3, care conține 0,500% COOH-GO, a prezentat o arhitectură mai lamelară și regiuni poroase mai deschise, dar și depuneri particulare vizibile în anumite zone. Aceste observații sugerează că toate cele trei concentrații de COOH-GO au permis menținerea parțială a structurii scaffoldului, însă răspunsul morfologic nu a fost strict proporțional cu concentrația de COOH-GO. Concentrațiile de 0,125% și 0,250% au părut asociate cu depuneri mai evidente, în timp ce concentrația de 0,500% a favorizat o morfologie mai stratificată și mai poroasă în anumite regiuni. Probele V4, V5 și V6, funcționalizate cu BMP prin incubare, au prezentat un comportament morfologic diferit față de probele fără BMP. În cazul V4, corespunzătoare materialului cu 0,125% COOH-GO și BMP, au fost observate zone lamelare, regiuni compacte și depuneri particulare cu contrast ridicat, mai ales în interiorul matricei. Aceste formațiuni pot fi corelate cu o posibilă activitate locală de mineralizare, susținută de prezența BMP, deși confirmarea compoziției necesită analize complementare.

Proba V5, cu 0,250% COOH-GO și BMP, a prezentat cele mai evidente aglomerări particulare dintre probele funcționalizate prin adsorbție fizică a BMP. După 8 și 12 săptămâni,

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

SEM a evidențiat numeroase depuneri dense, distribuite în masa scaffoldului, alături de zone fragmentate și regiuni compacte. Acest comportament sugerează o interacțiune intensă între scaffold și mediul biologic, posibil asociată cu efectul combinat al concentrației intermediare de COOH-GO și al prezenței BMP. Dintre probele V4-V6, V5 pare să indice cel mai pronunțat răspuns morfologic compatibil cu acumularea de material mineral sau cu depuneri anorganice locale. Proba V6, corespunzătoare materialului cu 0,500% COOH-GO și BMP, a prezentat o structură heterogenă, cu zone lamelare, pori de dimensiuni variabile și depuneri particulare vizibile în anumite regiuni. Comparativ cu V5, depunerile par mai puțin uniform distribuite și asociate cu zone localizate ale matricei. Acest aspect sugerează că o concentrație mai mare de COOH-GO nu a condus neapărat la o mineralizare mai intensă, ci mai degrabă la o reorganizare structurală complexă, cu alternanță între zone poroase, zone compacte și depuneri locale. Astfel, în seria probelor cu BMP adsorbit, proba V5 pare să ofere cel mai echilibrat comportament morfologic, prin asocierea dintre menținerea parțială a arhitecturii scaffoldului și apariția unor depuneri particulare pronunțate.

Probele V7, V8 și V9, funcționalizate cu BMP legat covalent prin sistemul EDC/NHS, au prezentat o morfologie distinctă față de probele cu BMP adsorbit. În general, aceste probe au fost caracterizate printr-o porozitate mai bine menținută, cavități largi și interconectate, pereți subțiri și fragmente lamelare, dar fără depuneri minerale evidente în zonele analizate. Proba V7, cu 0,125% COOH-GO și BMP legat covalent, a prezentat o rețea poroasă bine conturată, cu pereți fini și suprafețe relativ netede. Absența unor depozite dense sugerează că răspunsul morfologic a fost dominat de păstrarea arhitecturii scaffoldului și de remodelarea matricei, nu de acumularea unor formațiuni mineralizate vizibile. Proba V8, cu 0,250% COOH-GO și BMP legat covalent, a prezentat o arhitectură poroasă bine păstrată după 8 săptămâni și o fragmentare mai accentuată după 12 săptămâni. Totuși, nu au fost observate aglomerări dense sau particule cu contrast ridicat similare celor întâlnite la V4, V5 sau V6. Acest aspect poate indica faptul că imobilizarea covalentă a BMP a condus la o interacțiune diferită cu mediul

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

biologic, posibil prin reducerea eliberării rapide a BMP și prin menținerea factorului osteoinductiv mai strâns asociat cu matricea. Proba V9, cu 0,500% COOH-GO și BMP legat covalent, a prezentat o porozitate largă, cavități bine definite și pereți lamelari subțiri, fără depuneri minerale evidente. Dintre probele cu BMP legat covalent, V9 pare să păstreze cel mai clar caracterul poros și deschis al scaffoldului. Comparativ, probele cu BMP adsorbit fizic, V4-V6, au prezentat mai multe depuneri particulare cu posibil caracter mineral decât probele cu BMP legat covalent, V7-V9. Această diferență poate fi explicată prin disponibilitatea mai mare a BMP adsorbit fizic la nivelul suprafeței scaffoldului, ceea ce ar putea stimula mai rapid interacțiunile locale cu mediul biologic. În schimb, legarea covalentă prin EDC/NHS poate limita difuzia sau eliberarea BMP, menținând factorul atașat de matrice și favorizând mai degrabă stabilitatea structurală decât apariția unor depozite minerale evidente în imaginile SEM. Această interpretare trebuie privită cu prudență, deoarece SEM oferă informații morfologice, nu compoziționale. Raportând toate probele la control, introducerea COOH-GO a modificat vizibil comportamentul scaffoldurilor post-implantare. Probele fără BMP, V1-V3, au prezentat o creștere a rugozității, fragmentării și a depunerilor locale comparativ cu proba control. Probele cu BMP adsorbit, V4-V6, au evidențiat cele mai clare formațiuni particulare, compatibile cu posibile depuneri minerale, mai ales în cazul V5. În schimb, probele cu BMP legat covalent, V7-V9, au păstrat mai bine arhitectura poroasă și au prezentat mai puține semne morfologice de mineralizare evidentă. Prin urmare, funcționalizarea cu BMP și modul de imobilizare a acestuia au influențat semnificativ morfologia scaffoldurilor după implantare. Un aspect important observat în toate seriile este diferența dintre 8 și 12 săptămâni. În general, după 8 săptămâni, probele au prezentat structuri mai coerente, cu porozitate încă bine definită și cu semne moderate de remodelare. După 12 săptămâni, au devenit mai evidente fragmentarea, compactarea locală, exfolierea lamelelor și reorganizarea matricei. Aceste modificări indică evoluția proceselor de degradare și remodelare in vivo. În unele probe, în special V1, V2 și V4-V6, perioada mai lungă de implantare a fost asociată și cu apariția sau

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

accentuarea unor depuneri particulare, posibil de natură minerală. Analiza SEM a probelor post-implantare a demonstrat că scaffoldurile pe bază de gelatină, κ -carragenan, CNFs și COOH-GO au menținut parțial o arhitectură poroasă după 8 și 12 săptămâni de implantare, fără colaps complet al matricei. Proba control a prezentat o remodelare progresivă și fragmentare structurală, servind ca reper pentru evaluarea efectului COOH-GO și BMP.

Introducerea COOH-GO a influențat morfologia scaffoldurilor, prin creșterea rugozității suprafeței, apariția unor structuri lamelare și formarea locală a unor depuneri cu posibil caracter mineral. Dintre probele fără BMP, V1 și V2 au prezentat cele mai clare indicii morfologice de depuneri particulare, în timp ce V3 a evidențiat o structură mai lamelară și mai poroasă, cu depuneri mai localizate.

Funcționalizarea cu BMP prin incubare a fost asociată cu apariția celor mai evidente depuneri particulare în imaginile SEM. Dintre probele V4-V6, proba V5, conținând 0,250% COOH-GO și BMP, a prezentat cel mai pronunțat aspect compatibil cu mineralizarea locală, alături de o remodelare structurală accentuată. Acest rezultat sugerează că formula cu 0,250% COOH-GO și BMP poate reprezenta o variantă favorabilă pentru stimularea interacțiunii scaffoldului cu mediul biologic.

În cazul probelor cu BMP legat covalent prin EDC/NHS, V7-V9, SEM a evidențiat o porozitate mai bine conservată și absența unor depuneri minerale clare. Acest comportament sugerează că legarea covalentă a BMP a contribuit la stabilitatea scaffoldului și la menținerea arhitecturii poroase, însă nu a condus la apariția unor depozite mineralizate evidente în zonele analizate. Comparativ, probele cu BMP adsorbit fizic au prezentat un răspuns morfologic mai intens, prin depuneri particulare și compactare locală, în timp ce probele cu BMP legat covalent au evidențiat o conservare mai bună a structurii poroase. Astfel, în funcție de obiectivul urmărit, cele două strategii pot avea avantaje diferite: BMP adsorbit poate favoriza un răspuns morfologic mai activ, iar BMP legat covalent poate susține stabilitatea structurală a scaffoldului. Pe baza observațiilor SEM, proba V5 pare să prezinte cel mai favorabil echilibru

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

între remodelarea scaffoldului și apariția unor depuneri compatibile cu mineralizarea locală, în timp ce V7-V9 au evidențiat cele mai bune caracteristici de menținere a porozității. Totuși, identificarea exactă a depunerilor observate nu poate fi realizată doar prin SEM. Confirmarea naturii minerale și a compoziției chimice locale necesită analize complementare, precum EDS, FTIR, Raman sau teste histologice specifice pentru mineralizare.

III.1.5. Bibliografie

- [1] Gómez-Cerezo, M. N., Lozano, D., Arcos, D., Vallet-Regí, M., & Vaquette, C. (2020). The effect of biomimetic mineralization of 3D-printed mesoporous bioglass scaffolds on physical properties and in vitro osteogenicity. *Materials Science and Engineering: C*, 109, 110572. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110572>.
- [2] C Maia-Pinto, M. O., B Brochado, A. C., Teixeira, B. N., Sartoretto, S. C., Uzeda, M. J., N Alves, T. N., Alves, G. G., Calasans-Maia, M. D., & M Thiré, M. S. (2020). Biomimetic Mineralization on 3D Printed PLA Scaffolds: On the Response of Human Primary Osteoblasts Spheroids and In Vivo Implantation. *Polymers*, 13(1), 74. <https://doi.org/10.3390/polym13010074>.
- [3] L. Wang, D. Li, Y. Huang, R. Mao, B. Zhang, F. Luo, P. Gu, P. Song, X. Ge, J. Lu, X. Yang, Y. Fan, X. Zhang, K. Wang, Bionic Mineralized 3D-Printed Scaffolds with Enhanced In Situ Mineralization for Cranial Bone Regeneration. *Adv. Funct. Mater.* 2024, 34, 2309042. <https://doi.org/10.1002/adfm.202309042>
- [4] Hasan, A., Bagnol, R., Owen, R., Latif, A., Rostam, H. M., Elsharkawy, S., J Rose, R. A., Rodríguez-Cabello, J. C., Ghaemmaghami, A. M., Eglin, D., & Mata, A. (2022). Mineralizing Coating on 3D Printed Scaffolds for the Promotion of Osseointegration. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10, 836386. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.836386>

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

III.2. Captioulul 2

III.2. Analiza mecanică a probelor pe bază de gelatină, K-caragenan, CNFs și COOH-GO

III.2.1. Introducere

În cadrul proiectului „Advanced & personalized solutions for bone regeneration and complications associated with multiple myeloma”, Activitatea 3 vizează validarea in vivo a eficienței dispozitivelor REOSTEOMi, cu accent pe evaluarea substituenților osoși în modele experimentale de șoarece și pe controlul funcțional și de calitate al componentelor dezvoltate. În acest context, analiza mecanică a probelor pe bază de gelatină, κ -caragenan, nanofibre de celuloză și oxid de grafenă funcționalizat cu grupări carboxil reprezintă o etapă necesară pentru caracterizarea comportamentului structural al formulărilor propuse ca suporturi pentru regenerarea osoasă. Scaffold-urile destinate aplicațiilor osoase trebuie să prezinte o stabilitate mecanică suficientă pentru a permite manipularea, implantarea și menținerea integrității structurale în mediul biologic, fără a compromite interacțiunea cu țesuturile și procesele celulare implicate în regenerare [1]. Matricea formată din gelatină și κ -caragenan oferă un cadru polimeric biocompatibil, cu proprietăți de gelifiere și capacitate de hidratare, însă performanța mecanică a acestor sisteme poate necesita îmbunătățire pentru utilizare ca substituenți osoși [2]. În acest sens, nanofibrele de celuloză pot contribui la ranforsarea rețelei polimerice, iar COOH-GO poate influența rigiditatea, rezistența și coeziunea internă a materialului prin interacțiuni cu componentele matricei [3]. Evaluarea mecanică permite compararea formulărilor obținute și aprecierea influenței compoziției asupra rezistenței la solicitare și a comportamentului la deformare. Rezultatele obținute contribuie la controlul funcțional și de calitate al probelor dezvoltate în cadrul Activității 3, oferind informații relevante pentru selecția formulărilor cu potențial adecvat pentru validarea in vivo în modele de șoarece. Astfel, această analiză susține corelarea proprietăților structurale ale scaffold-urilor

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

cu cerințele aplicațiilor de regenerare osoasă în contextul complicațiilor asociate mielomului multiplu.

III.2.2. Materiale și metode

III.2.2.1. Material

Gelatină obținută din piele de pește, k-caragenan, COOH-GO, clorura de calciu și genipin au fost achiziționate de la Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, SUA). Nanofibrele de celuloză au fost achiziționate de la Novarials (USA). Formulările obținute pentru dezvoltarea scaffoldurilor au fost concepute pe baza unei matrice polimerice naturale, codificate cu denumirea GCK, GCK-CG, care reflectă compoziția de bază utilizată: G-gelatină, K-carragenan, C-nanofibre de celuloză (CNF) și COOH-GO (CG).

Tabelul 1 –Compoziția probelor implantate.

COD	Gelatină	Nanofibre de celuloză	K-carragenan	Clorură de calciu	Genipin	COOH-GO
Setul 5 GCK	6.66%	0.23%	1.33%	2%	0.5%	0
Setul 5 GCK-CG (0.125%)	6.66%	0.23%	1.33%	2%	0.5%	0.125%
Setul 5 GCK-CG (0.25%)	6.66%	0.23%	1.33%	2%	0.5%	0.25%
Setul 5 GCK-CG (0.5%)	6.66%	0.23%	1.33%	2%	0.5%	0.5%

III.2.2.2. Metode

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

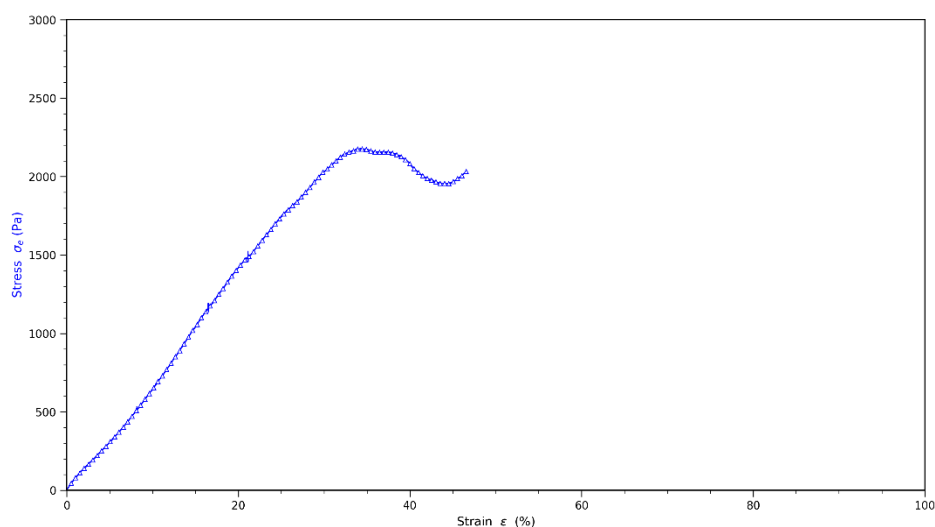
Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

Caracterizarea mecanică a probelor a fost realizată prin testare la compresie, utilizând echipamentul FRTS-100N, prevăzut cu celulă de sarcină adecvată pentru analiza materialelor moi și hidrogelurilor. Probele au fost testate în regim compresiv, iar răspunsul mecanic a fost înregistrat sub forma curbelor stres-deformare, exprimate ca Stress, σ_e (Pa) în funcție de Strain, ϵ (%). Testele au fost efectuate pe probe hidratate, la temperatura camerei, urmărindu-se evoluția stresului mecanic până la deformări ridicate, pentru evaluarea capacității portante și a stabilității structurale a scaffold-urilor.

Pentru fiecare formulare au fost analizate replici independente, iar curbele obținute au fost utilizate pentru compararea comportamentului mecanic al probei martor și al probelor compozite cu conținut diferit de COOH-GO. Parametrii analizați au inclus forma curbei stres-deformare, valoarea maximă a stresului atinsă în timpul compresiei și stabilitatea răspunsului mecanic la deformare progresivă. Datele obținute au fost prelucrate folosind software-ul Origin și reprezentate grafic în secțiunea de mai jos.

III.2.3. Rezultate și discuții



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

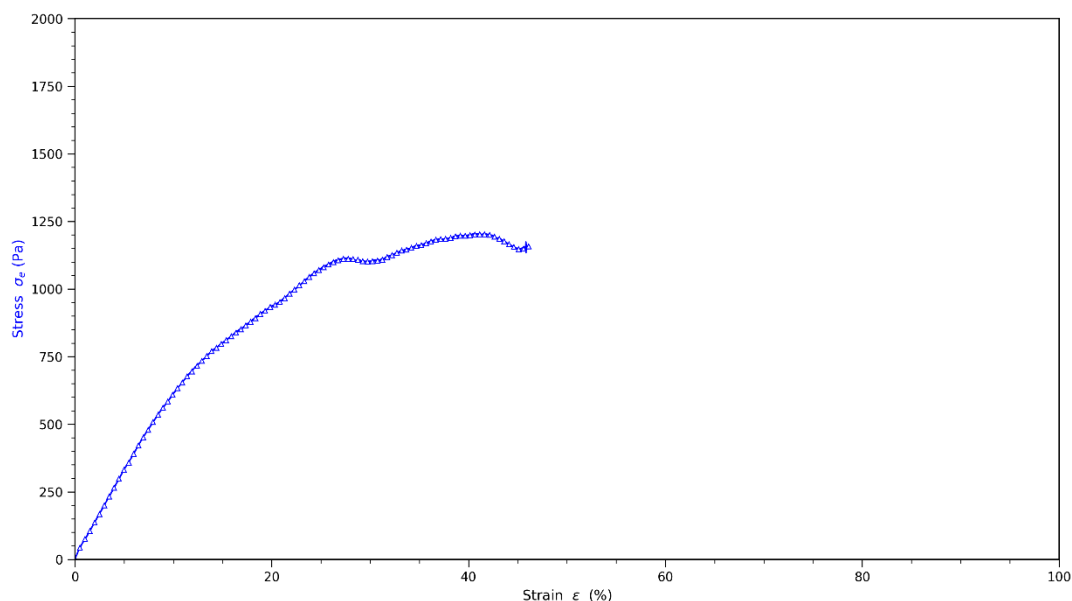


Figura 1. Curbe reprezentative stres-deformare pentru scaffold-urile pe bază de gelatină, κ -caragenan și CNFs, selectate pentru evaluarea preliminară a comportamentului mecanic la compresie.

Cele două curbe ale probei blank din figura 1 indică un comportament mecanic relativ similar, caracterizat printr-o creștere progresivă a stresului odată cu deformarea, urmată de o tendință de plafonare și ușoare variații la deformări mai mari. Prima probă atinge o valoare maximă mai ridicată, de aproximativ 2.1–2.2 kPa, la o deformare de aproximativ 35–40%, ceea ce sugerează o rezistență mecanică ușor superioară. A doua probă prezintă un răspuns mai redus, cu un stres maxim de aproximativ 1.2 kPa, dar cu o evoluție mai uniformă până la finalul testului. În ansamblu, proba blank prezintă o capacitate portantă limitată, specifică unei matrice polimerice neranforsate. Aceste rezultate pot fi utilizate ca referință pentru evaluarea efectului de ranforsare indus prin introducerea COOH-GO în formulările compozite. În figura 2 graficele reprezentative pentru formularea pe bază de gelatină, κ -caragenan, CNFs și 0.25% COOH-GO evidențiază un comportament mecanic de tip compresiv cu o creștere inițială progresivă a stresului, urmată de atingerea unei valori maxime și de o ușoară scădere sau stabilizare la deformări mai mari. Prima probă atinge un stres maxim de aproximativ 1.45 kPa, la o

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

deformare de aproximativ 25-28%, după care se observă o scădere parțială și o revenire a răspunsului mecanic spre finalul testului. A doua probă prezintă o valoare maximă mai ridicată, de aproximativ 2.1 kPa, la o deformare de aproximativ 25-30%, urmată de o scădere moderată și o stabilizare în jurul valorii de 1.8-1.9 kPa.

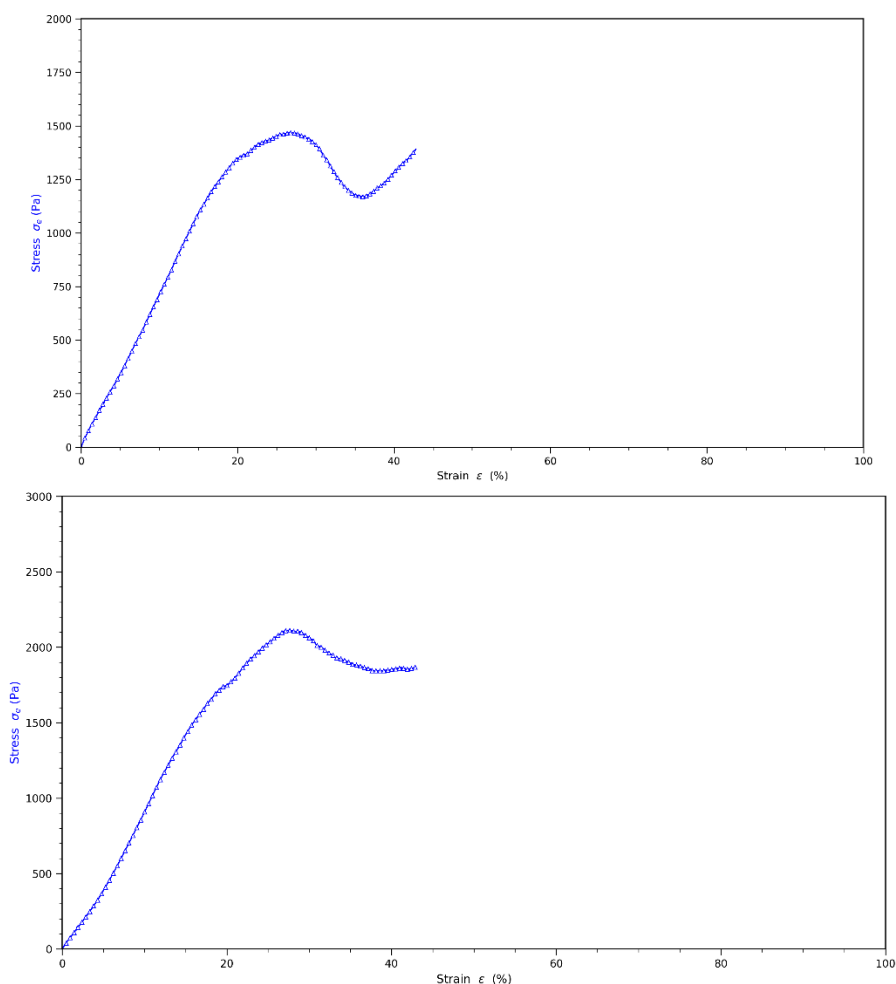


Figura 2. Curbe reprezentative stres-deformare pentru scaffold-urile pe bază de gelatină, κ -caragenan, CNFs și 0.25% GO-COOH selectate pentru evaluarea preliminară a comportamentului mecanic la compresie.

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

Comparativ cu proba blank, introducerea a 0.25% COOH-GO nu determină o creștere mecanică evidentă și constantă în ambele replici, însă contribuie la menținerea unui răspuns compresiv stabil după atingerea maximului. Diferențele dintre cele două curbe sugerează o variabilitate a comportamentului mecanic, posibil asociată cu distribuția locală a COOH-GO, gradul de omogenizare al formulării sau mici diferențe structurale între probe. În această etapă, formularea cu 0.25% COOH-GO poate fi considerată o variantă preliminară cu răspuns mecanic moderat, care necesită testări suplimentare pentru confirmarea reproductibilității.

Curbele din figura 3, corespunzătoare formulării pe bază de gelatină, κ -caragenan, CNFs și 0.5% COOH-GO indică un comportament mecanic îmbunătățit față de probele blank și față de formularea cu 0.25% COOH-GO. Răspunsul la compresie este caracterizat printr-o creștere progresivă a stresului odată cu deformarea, urmată de o accentuare puternică a rezistenței la deformări mari. Acest profil sugerează compactarea treptată a rețelei polimerice și o capacitate mai bună de preluare a solicitării mecanice. Prima probă atinge un stres maxim de aproximativ 7.5-7.8 kPa, la o deformare de aproximativ 80-82%, în timp ce a doua probă ajunge la aproximativ 5.2-5.3 kPa, la o deformare de aproximativ 75-77%. Deși există diferențe între replici, ambele curbe prezintă aceeași tendință generală de creștere continuă, fără o cedare structurală evidentă în intervalul analizat. În ansamblu, includerea a 0.5% COOH-GO pare să contribuie la consolidarea mecanică a scaffold-urilor, probabil prin interacțiuni între faza grafenică funcționalizată, CNFs și matricea polimerică de gelatină/ κ -caragenan. Rezultatele indică un răspuns mecanic promițător, însă vor fi necesare testări suplimentare pentru confirmarea reproductibilității și pentru calcularea valorilor medii relevante ale parametrilor mecanici.

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

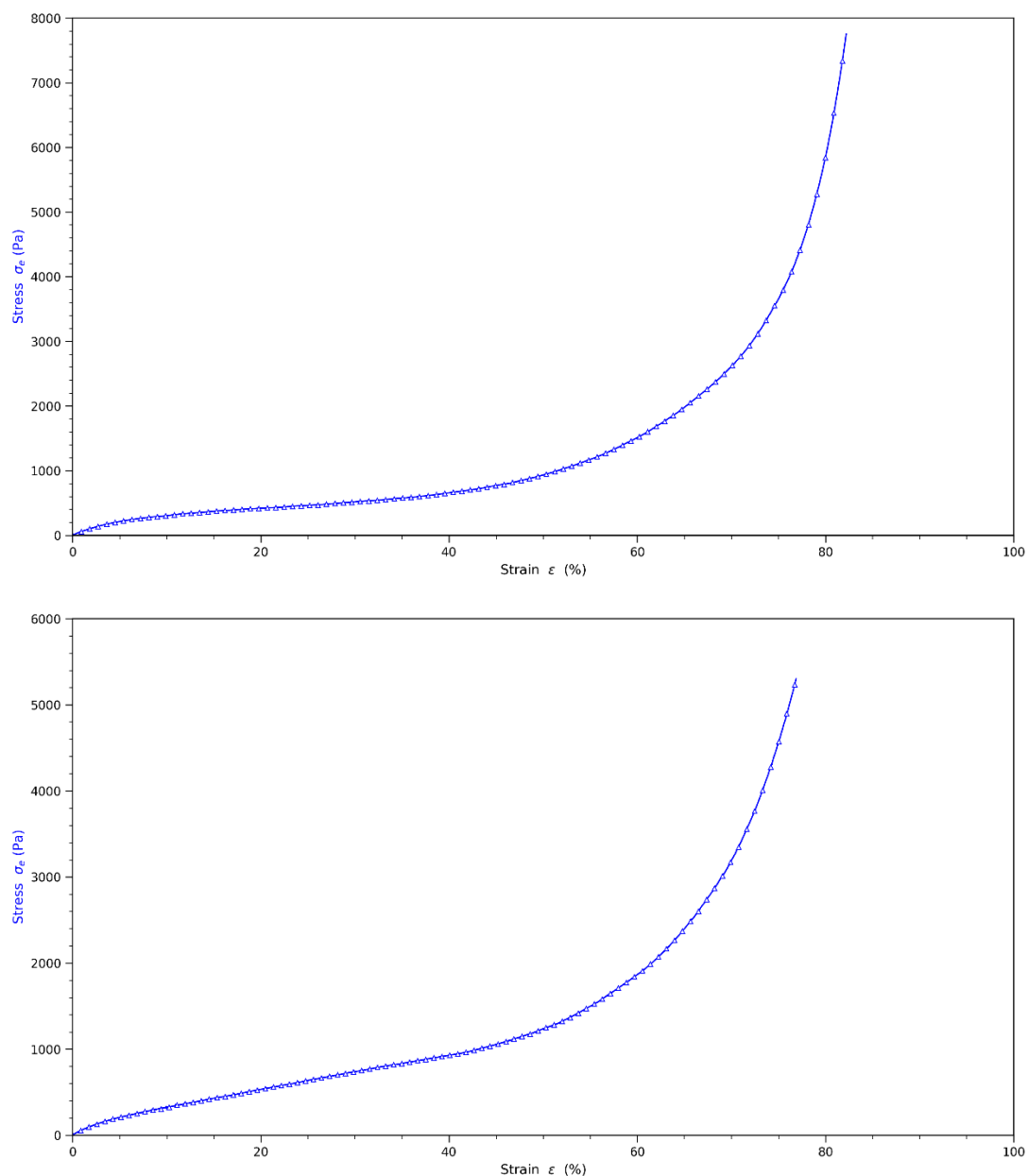


Figura 3. Curbe reprezentative stres-deformare pentru scaffold-urile pe bază de gelatină, κ -caragenan, CNFs și 0.50% GO-COOH selectate pentru evaluarea preliminară a comportamentului mecanic la compresie.

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

Curbele de compresiune (figura 4) ale formulării pe bază de gelatină, κ -caragenan, CNFs și 1% COOH-GO arată un răspuns mecanic mult mai intens comparativ cu celelalte compoziții evaluate. În ambele cazuri, stresul crește gradual în prima parte a testului, la deformări mici și intermediare, după care se observă o creștere abruptă la deformări ridicate. Acest comportament sugerează densificarea progresivă a scaffold-ului în timpul compresiei și creșterea rigidității structurii pe măsură ce materialul este sollicitat.

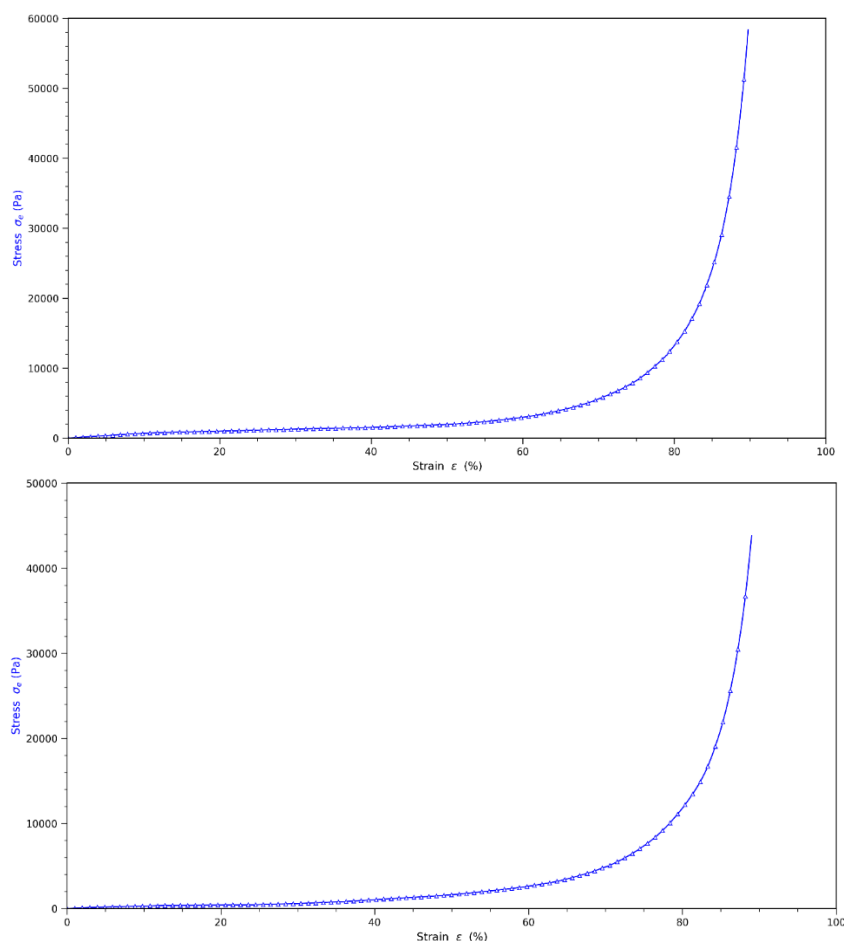


Figura 4. Curbe reprezentative stres-deformare pentru scaffold-urile pe bază de gelatină, κ -caragenan, CNFs și 1% GO-COOH selectate pentru evaluarea preliminară a comportamentului mecanic la compresie.

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

Prima probă prezintă un stres maxim de aproximativ 58 kPa, atins la o deformare de aproximativ 90-92%, în timp ce a doua probă ajunge la aproximativ 43-44 kPa, la o deformare de aproximativ 88-90%. Aceste valori sunt net superioare celor înregistrate pentru proba blank și pentru formulările cu 0.25% și 0.5% COOH-GO, indicând faptul că adaosul de 1% COOH-GO contribuie semnificativ la creșterea rezistenței mecanice a matricei formate din gelatină, κ -caragenan și CNFs. Diferențele dintre cele două replici pot fi explicate prin variații ale omogenității probei, distribuției locale a COOH-GO, gradului de hidratare sau geometriei specimenelor testate. Cu toate acestea, ambele curbe păstrează aceeași tendință generală, caracterizată prin creșterea accentuată a stresului la compresie și printr-o stabilitate mecanică ridicată la deformări mari. Astfel, formularea cu 1% COOH-GO indică cel mai bun potențial de ranforsare mecanică dintre probele analizate preliminar, urmând ca rezultatele să fie confirmate prin testări suplimentare și prin extinderea numărului de replici.

III.2.4. Concluzii

Rezultatele preliminare ale testelor mecanice la compresie au evidențiat diferențe între formulările pe bază de gelatină, κ -caragenan, CNFs și COOH-GO. Proba martor a prezentat un răspuns mecanic redus, specific unei matrice polimerice neranforsate, în timp ce introducerea COOH-GO a determinat modificări ale comportamentului la compresie. Formulările cu 0.5% și 1% COOH-GO au indicat o creștere mai evidentă a stresului la deformări mari, sugerând o contribuție a oxidului de grafenă funcționalizat cu grupări carboxil la consolidarea rețelei polimerice și la îmbunătățirea capacității portante a scaffold-urilor. Dintre formulările analizate, proba cu 1% COOH-GO a prezentat cel mai pronunțat răspuns mecanic, cu valori ale stresului semnificativ mai mari comparativ cu proba martor și cu probele care conțin concentrații mai reduse de COOH-GO. Acest comportament poate fi asociat cu o interacțiune mai eficientă între COOH-GO, CNFs și matricea de gelatină/ κ -caragenan, ceea ce poate contribui la rigidizarea scaffold-ului în timpul compresiei. Totuși, diferențele observate între

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

replici indică necesitatea unei interpretări prudente a rezultatelor, deoarece variațiile pot fi influențate de omogenitatea formulării, distribuția locală a COOH-GO, gradul de hidratare, geometria probelor și condițiile de stabilizare. Având în vedere caracterul preliminar al acestor determinări, probele trebuie repetate la aparatul de compresiune, pe un număr mai mare de replici, pentru confirmarea reproductibilității și pentru stabilirea unor valori medii relevante ale parametrilor mecanici. În etapa următoare se vor realiza și alte studii mecanice, inclusiv teste de forfecare și evaluări suplimentare ale comportamentului vâscoelastic, utilizând același echipament, pentru o caracterizare mai completă a stabilității structurale și funcționale a scaffold-urilor. Aceste analize vor permite corelarea compoziției materialelor cu performanța mecanică și vor susține selecția formulărilor cu potențial adecvat pentru aplicații în regenerarea osoasă.

III.2.5. Bibliografie

- [1] Suamte, L., Tirkey, A., Barman, J., & Jayasekhar Babu, P. (2022). Various manufacturing methods and ideal properties of scaffolds for tissue engineering applications. *Smart Materials in Manufacturing*, 1, 100011. <https://doi.org/10.1016/j.smmf.2022.100011>
- [2] Loukelis, K., Papadogianni, D., & Chatzinikolaidou, M. (2022). Kappa-carrageenan/chitosan/gelatin scaffolds enriched with potassium chloride for bone tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, 209, 1720-1730. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.04.129>
- [3] Chen, J., Ma, A., Zhang, Y., Sun, L., Yang, K., Vanegas Sáenz, J. R., & Hong, G. (2025). Mechanical and biological properties of cellulose nanofibers as a dental biomaterial. *Journal of Dental Sciences*, 20(3), 1436-1446. <https://doi.org/10.1016/j.jds.2025.02.006>

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

III.3. Captiolul 3

III.3. Analiza FTIR a probelor pe bază de gelatină, K-caragenan, CNFs și COOH-GO pre-implantare și post-implantare

Activitatea 3. Validarea in vivo a eficienței dispozitivelor REOSTEOMi

Subactivitatea 3.3. Investigarea in vivo a inducerii formării de țesut osos în șoareci osteoporotici de către factorii terapeutici rezultați din Activitățile 1 și 2

Subactivitatea 3.4. Controlul funcțional și de calitate al componentelor Activității 3.

III.3.1. Introducere

Spectroscopia în infraroșu cu transformată Fourier (FTIR) reprezintă una dintre cele mai utilizate tehnici spectroscopice pentru caracterizarea compoziției chimice și identificarea grupărilor funcționale din materiale organice și anorganice. Metoda se bazează pe interacțiunea radiației infraroșii cu materialul, determinând absorbția unor frecvențe specifice corespunzătoare vibrațiilor legăturilor chimice din molecule. Spectrul obținut constituie o „amprentă moleculară” caracteristică fiecărui material, permițând identificarea compușilor și evaluarea modificărilor structurale apărute în urma diferitelor procese de sinteză sau tratamente aplicate materialului [1,2].

Principiul de funcționare al FTIR constă în înregistrarea unui interferogram cu ajutorul unui interferometru Michelson și transformarea matematică a acestuia prin algoritmul Fourier pentru obținerea spectrului de absorbție în funcție de numărul de undă (cm^{-1}). Comparativ cu spectroscopia IR dispersivă convențională, tehnica FTIR oferă avantaje semnificative, precum rezoluție spectrală ridicată, sensibilitate crescută, timp redus de analiză și un raport semnal-zgomot superior [2,3].

În domeniul biomaterialelor și al ingineriei tisulare, FTIR este utilizată frecvent pentru investigarea compoziției chimice a biomaterialelor. Analiza spectrelor FTIR permite

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

identificarea benzilor caracteristice grupărilor și a altor componente prezente în structură. De asemenea, tehnica poate evidenția modificările chimice produse în urma proceselor de sinterizare, dopare sau incorporare a diferiților aditivi, oferind informații importante privind puritatea și stabilitatea materialelor obținute [1,4,5].

În cadrul prezentei lucrări, analiza FTIR a fost utilizată pentru caracterizarea scaffoldurilor fabricate prin imprimare 3D și pentru identificarea grupărilor funcționale specifice componentelor utilizate. Interpretarea benzilor de absorbție permite evaluarea structurii chimice a materialelor obținute și evidențierea eventualelor modificări apărute în urma proceselor tehnologice aplicate.

III.3.2. Materiale și metode

Gelatină obținută din piele de pește, k-caragenan, COOH-GO, clorura de calciu și genipin au fost achiziționate de la Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, SUA). Nanofibrele de celuloză au fost achiziționate de la Novarials (USA). Formulările obținute pentru dezvoltarea scaffoldurilor au fost concepute pe baza unei matrice polimerice naturale, codificate cu denumirea GCK, GCK-CG, care reflectă compoziția de bază utilizată: G-gelatină, K-carragenan, C-nanofibre de celuloză (CNF) și COOH-GO (CG). Tabelul 1 sintetizează codificarea probelor implantate și diferențele de compoziție dintre acestea. Proba control C a fost utilizată ca material de referință. Probele V1-V3 conțin matricea polimerică GCK funcționalizată cu COOH-GO în concentrații crescătoare, de 0,125%, 0,250% și 0,500%. Probele V4-V6 includ, pe lângă COOH-GO, factorul osteogenic BMP, fiind utilizate pentru evaluarea efectului acestuia asupra răspunsului tisular și a procesului de mineralizare. Probele V7-V9 conțin BMP imobilizat covalent prin activare cu EDC/NHS, ceea ce permite compararea dintre efectul BMP asociat fizic și cel al BMP legat covalent de material. Această organizare experimentală permite analizarea comparativă a influenței concentrației de COOH-

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

GO, a prezenței BMP și a modului de imobilizare a BMP asupra comportamentului scaffoldurilor în modelul in vivo.

Tabelul 1. Terminologia probelor implantate

Nr. Crt.	Lot	Material
1	C	Material control
2	V1	Material 0,125 GO-COOH
3	V2	Material 0,250 GO-COOH
4	V3	Material 0,500 GO-COOH
5	V4	Material + BMP 0,125 GO-COOH
6	V5	Material + BMP 0,250 GO-COOH
7	V6	Material + BMP 0,500 GO-COOH
8	V7	Material + BMP +edc 0,125 (legat covalent) GO-COOH
9	V8	Material + BMP +edc 0,250 (legat covalent) GO-COOH
10	V9	Material + BMP +edc 0,500 (legat covalent) GO-COOH

III.3.3. Rezultate și discuții

III.3.3.1. Pre-implantare

Spectrele FTIR ale hidrogelurilor pe bază de gelatină/κ-caragenan/nanofibrile de celuloză (CNF) și ale derivatelor acestora funcționalizate cu grafenă carboxilată și BMP sunt

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

prezentate în Figura 1. Toate probele au evidențiat benzile caracteristice matricei polimerice, confirmând păstrarea structurii hidrogelului după incorporarea grafenei și imobilizarea BMP.

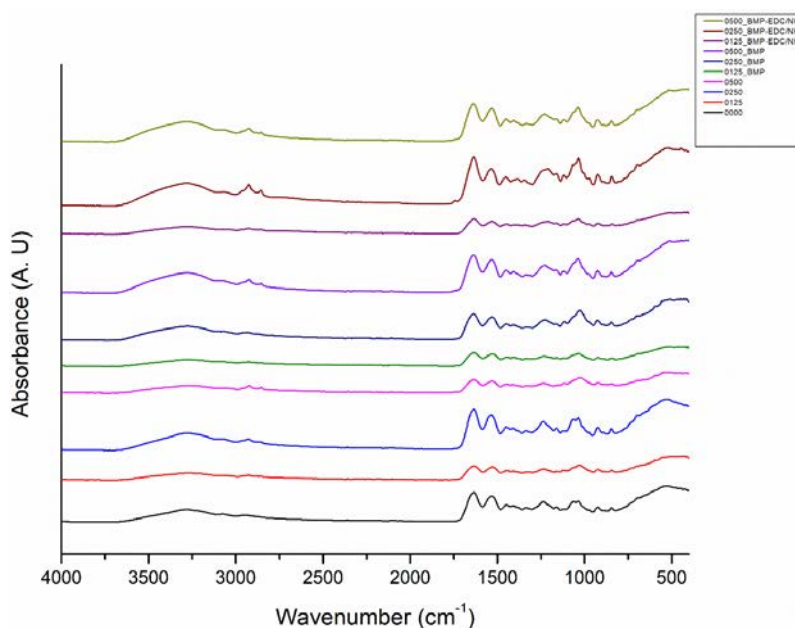


Figura 1. Spectrele FTIR ale probelor analizate

Banda largă de absorbție observată în jurul valorilor $3280\text{--}3290\text{ cm}^{-1}$ este atribuită vibrațiilor de întindere ale grupărilor hidroxil (-OH) și amină (-NH), provenite din gelatină, κ -caragenan, nanofibrilele de celuloză și grafena carboxilată. Această bandă a fost evidențiată în special pentru probele 0000, 0250, 0250_BMP, 0500_BMP, 0250 BMP-EDC/NHS și 0500 BMP-EDC/NHS, sugerând existența unor interacțiuni extinse de tip legătură de hidrogen în cadrul rețelei hidrogelului.

Banda caracteristică amidei I a gelatinei a fost observată la aproximativ $1635\text{--}1640\text{ cm}^{-1}$ pentru toate formulările analizate. Aceasta este atribuită în principal vibrațiilor de întindere ale grupărilor carbonil (C=O) din legăturile peptidice și indică menținerea structurii proteice. Banda amidei II, localizată între 1526 și 1535 cm^{-1} , a fost de asemenea identificată în toate probele și corespunde vibrațiilor de deformare ale grupărilor N-H cuplate cu vibrațiile de

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

Întindere C-N. Prezența constantă a benzilor amida I și amida II confirmă existența gelatinei și a structurilor proteice asociate BMP în toate materialele investigate.

Benzile observate în jurul valorilor $1447\text{--}1455\text{ cm}^{-1}$ și 1407 cm^{-1} sunt atribuite vibrațiilor de deformare ale grupărilor CH_2 și, respectiv, vibrațiilor de întindere simetrică ale grupărilor carboxilat ($-\text{COO}^-$). Intensificarea acestor benzi în probele care conțin grafenă, în special în 0500_BMP și 0500 BMP-EDC/NHS, sugerează contribuția grupărilor carboxilice specifice grafenei oxidate. În regiunea de amprentă spectrală au fost identificate mai multe benzi caracteristice κ -caragenanului și nanofibrilelor de celuloză. Vârfurile situate între 1230 și 1240 cm^{-1} sunt asociate vibrațiilor de întindere asimetrică ale grupărilor ester sulfat ($\text{O}=\text{S}=\text{O}$) specifice κ -caragenanului. Benzile localizate între 1150 și 1165 cm^{-1} sunt atribuite vibrațiilor punților glicozidice C-O-C, iar cele observate între 1030 și 1065 cm^{-1} corespund vibrațiilor de întindere C-O ale scheletului polizaharidic. Prezența acestor benzi în toate probele indică faptul că adaosul de grafenă și procesul de imobilizare a BMP nu au afectat structura fundamentală a matricei polizaharidice. Vârfurile identificate în jurul valorilor $925\text{--}928\text{ cm}^{-1}$ și $841\text{--}850\text{ cm}^{-1}$ sunt caracteristice κ -caragenanului. Banda din jurul valorii de 925 cm^{-1} este asociată reziduurilor de 3,6-anhidro-D-galactoză, în timp ce banda de aproximativ 845 cm^{-1} este atribuită unităților D-galactoză-4-sulfat. Menținerea acestor semnale în toate spectrele confirmă integritatea structurală a componentei de κ -caragenan după funcționalizare. Incorporarea grafenei carboxilate a determinat modificări spectrale subtile, fără apariția unor benzi complet noi. Creșterea concentrației de grafenă de la 0,125% la 0,5% a fost însoțită de apariția și accentuarea benzilor din regiunea $2930\text{--}2855\text{ cm}^{-1}$, atribuite vibrațiilor de întindere ale legăturilor alifatice C-H, precum și de o contribuție mai pronunțată a benzilor asociate grupărilor carboxilice în jurul valorii de 1400 cm^{-1} . Aceste observații indică integrarea cu succes a grafenei în rețeaua hidrogelului și stabilirea unor interacțiuni intermoleculare între grupările funcționale ale grafenei și matricea polimerică. Imobilizarea BMP a produs modificări suplimentare în regiunile asociate structurilor proteice. Probele care conțin BMP au

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

prezentat ușoare deplasări ale benzilor amida I și amida II comparativ cu hidrogelurile care conțin doar grafenă, sugerând existența unor interacțiuni între moleculele de BMP și componentele hidrogelului. Astfel de deplasări sunt frecvent asociate modificării mediului local al legăturilor peptidice și adsorbției proteinelor pe suprafețe care conțin grafenă.

Modificări spectrale mai evidente au fost observate pentru probele BMP-EDC/NHS. În special, benzile suplimentare din jurul valorilor $1337\text{--}1345\text{ cm}^{-1}$ și intensificarea semnalelor din regiunea $1118\text{--}1162\text{ cm}^{-1}$ au devenit mai pronunțate, în special pentru probele 0250 BMP-EDC/NHS și 0500 BMP-EDC/NHS. Aceste modificări pot fi atribuite formării unor noi legături amidice rezultate în urma reacției de cuplare mediată de EDC/NHS între grupările carboxil ale grafenei și grupările amino ale BMP. De asemenea, deplasările ușoare observate pentru banda esterilor sulfat ($1236 \rightarrow 1205\text{--}1227\text{ cm}^{-1}$) și accentuarea vibrațiilor asociate grupărilor amidice susțin ipoteza unei imobilizări covalente eficiente a BMP pe matricea hidrogelică funcționalizată cu grafenă.

În ansamblu, rezultatele FTIR confirmă incorporarea cu succes a grafenei carboxilate în sistemul hidrogelic gelatină/ κ -caragenan/CNF și oferă indicii privind imobilizarea atât necovalentă, cât și covalentă a BMP. Menținerea benzilor caracteristice gelatinei, κ -caragenanului și nanofibrilelor de celuloză demonstrează că procesele de funcționalizare nu au compromis integritatea structurală a rețelei hidrogelice, în timp ce deplasările de bandă și modificările de intensitate observate sugerează stabilirea unor interacțiuni specifice între grafenă, BMP și matricea polimerică.

III.3.3.2. Post-implantare

Spectrele FTIR evidențiază prezența benzilor caracteristice matricei polimerice pe bază de gelatină, κ -caragenan și nanofibre de celuloză, împreună cu modificări asociate interacțiunii materialului cu mediul biologic după implantare. În toate probele se observă domeniul larg din jurul $3200\text{--}3400\text{ cm}^{-1}$, atribuit vibrațiilor O-H și N-H, provenite din componentele polimerice, apă legată și grupări funcționale ale gelatinei, celulozei și GO-COOH. Benzile din zona 2850--

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

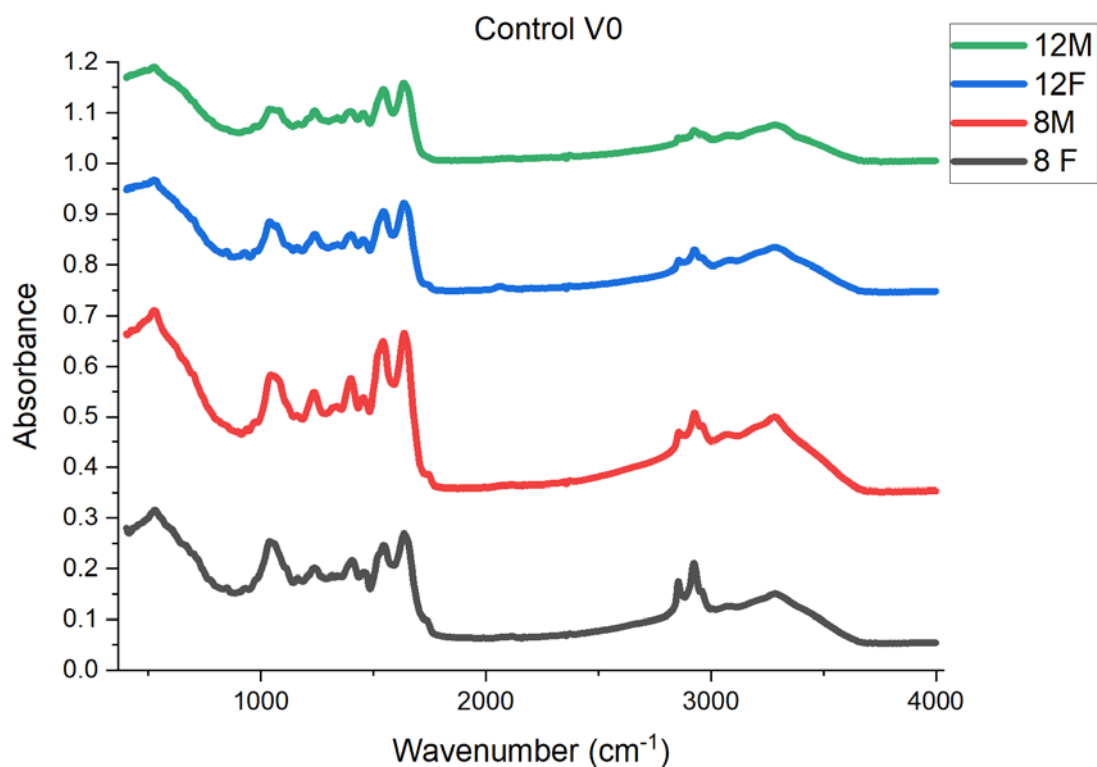
Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

2950 cm^{-1} pot fi asociate vibrațiilor C-H, iar semnalele din jurul 1600-1650 cm^{-1} și 1500-1550 cm^{-1} corespund în principal benzilor amidice ale gelatinei, respectiv Amida I și Amida II. Domeniul 1000-1150 cm^{-1} include contribuții ale legăturilor C-O-C și C-O specifice polizaharidelor, dar poate include și contribuții ale grupărilor fosfat, atunci când are loc depunere minerală.

În cazul probei V0/control, spectrele păstrează profilul specific matricei organice, cu benzi evidente pentru componentele polimerice. La 8 săptămâni, mai ales pentru proba 8F, se observă semnale mai bine definite în zona 900-1100 cm^{-1} și în domeniul 1400-1650 cm^{-1} , ceea ce sugerează modificări ale materialului după implantare și posibile depuneri anorganice incipiente. Totuși, controlul nu indică un profil mineral atât de evident comparativ cu probele funcționalizate cu BMP.



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

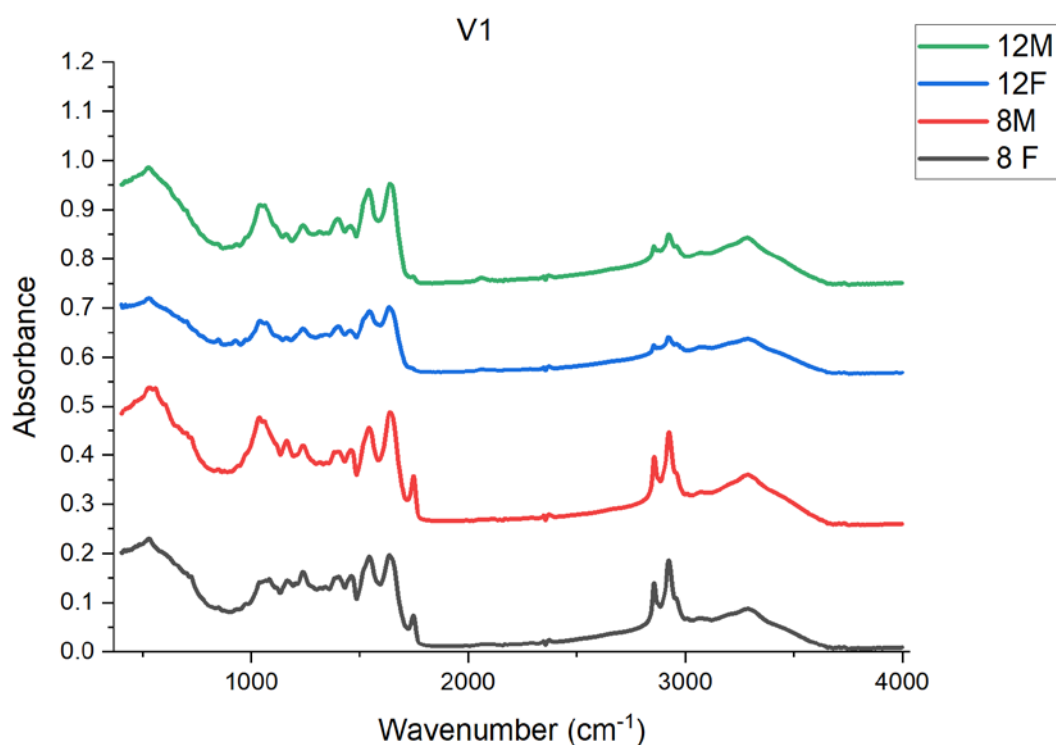
Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

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. Spectre FTIR ale probei control V0 după explantare la 8 și 12 săptămâni, în funcție de sexul animalelor.

Pentru probele V1-V3, care conțin GO-COOH fără BMP, se observă menținerea benzilor caracteristice matricei organice, cu diferențe dependente de concentrația de GO-COOH. Proba V1, cu 0,125% GO-COOH, prezintă un profil relativ apropiat de control, cu benzi organice clare și semnale moderate în regiunea $900-1100\text{ cm}^{-1}$. Probele V2 și V3, cu 0,250% și 0,500% GO-COOH, arată modificări mai evidente în regiunea $1000-1100\text{ cm}^{-1}$ și în zona carbonil/amidică, ceea ce poate indica o interacțiune mai puternică între matricea polimerică, GO-COOH și componentele biologice formate după implantare. În special la 12 săptămâni, spectrele V2 și V3 prezintă benzi mai bine conturate, ceea ce sugerează o evoluție a materialului în timp, însă mineralizarea nu este la fel de clar susținută ca în probele cu BMP.



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

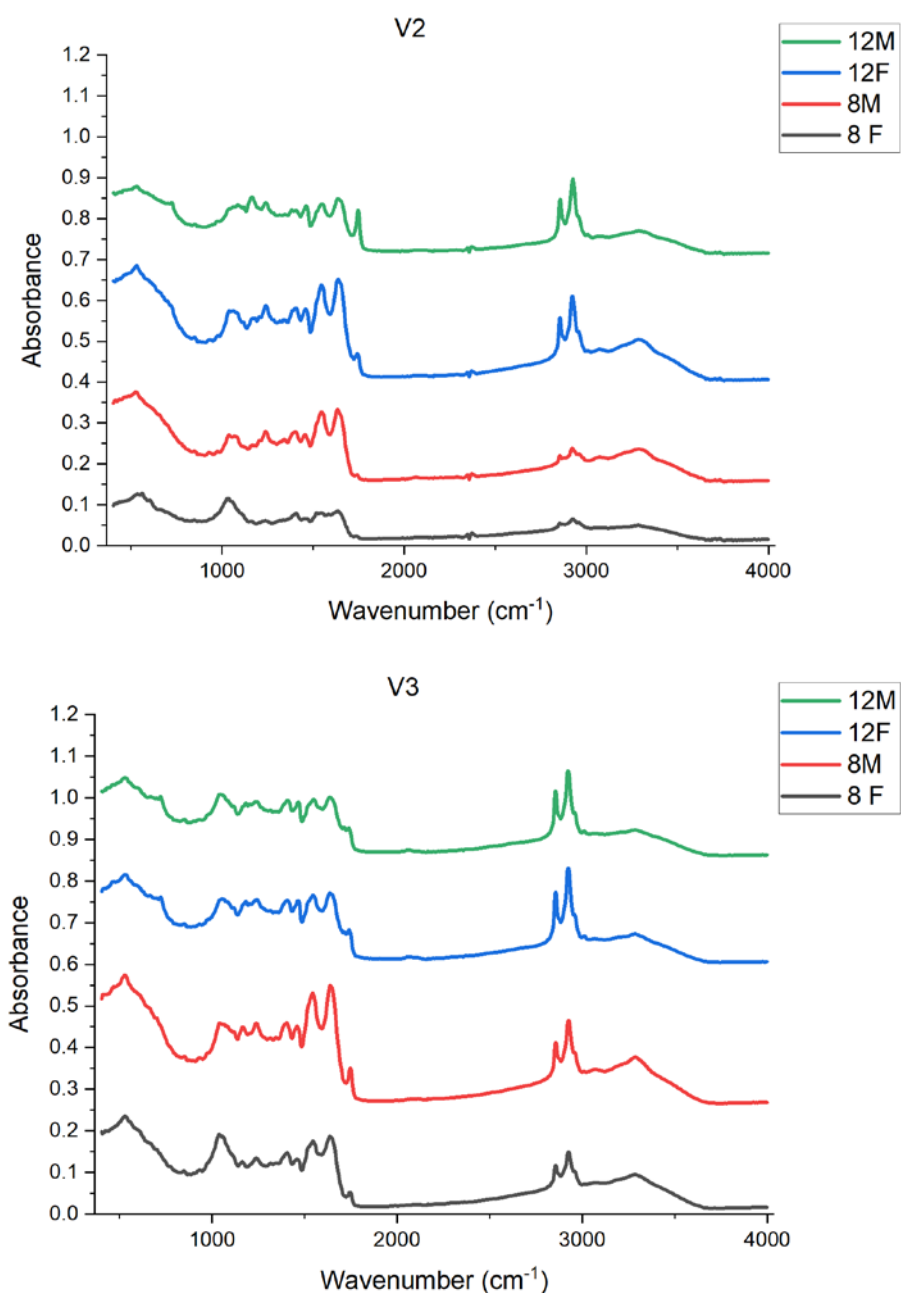


Figura 3. Spectre FTIR ale probelor V1-V3, corespunzătoare materialelor GCK-CG cu concentrații crescătoare de GO-COOH, după explantare la 8 și 12 săptămâni.

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

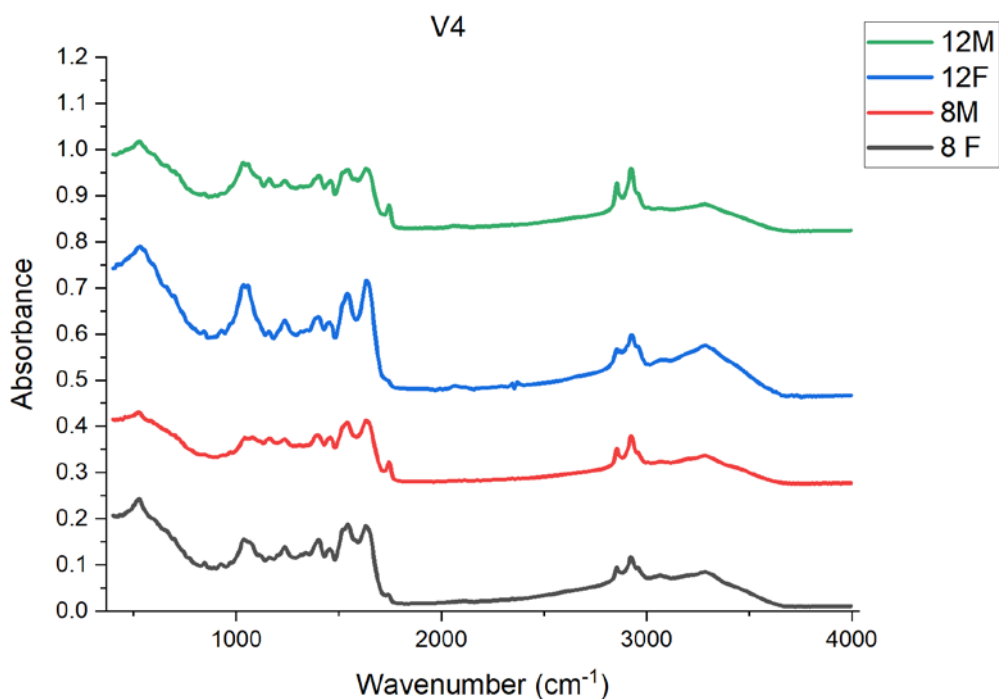
Codul proiectului: 213

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

Probele V4-V6, corespunzătoare materialelor cu BMP și concentrații crescătoare de GO-COOH, prezintă cele mai relevante modificări pentru interpretarea procesului de mineralizare. În aceste spectre, se observă semnale mai bine definite în domeniul 900-1100 cm^{-1} , compatibile cu vibrații asociate grupărilor fosfat, suprapuse peste contribuțiile polizaharidice ale matricei. De asemenea, benzile din zona 1400-1500 cm^{-1} pot sugera contribuții carbonatice, asociate cu formarea unei faze minerale de tip apatită carbonată. Aceste observații susțin faptul că probele V4, V5 și V6 prezintă un comportament mai favorabil pentru depunerea minerală, în acord cu prezența BMP. Efectul pare mai vizibil după 12 săptămâni, ceea ce indică o evoluție progresivă a interacțiunii dintre material și țesutul gazdă. Dintre probele cu BMP, V4 prezintă un profil relativ echilibrat, cu benzi organice păstrate și semnale minerale moderate.



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

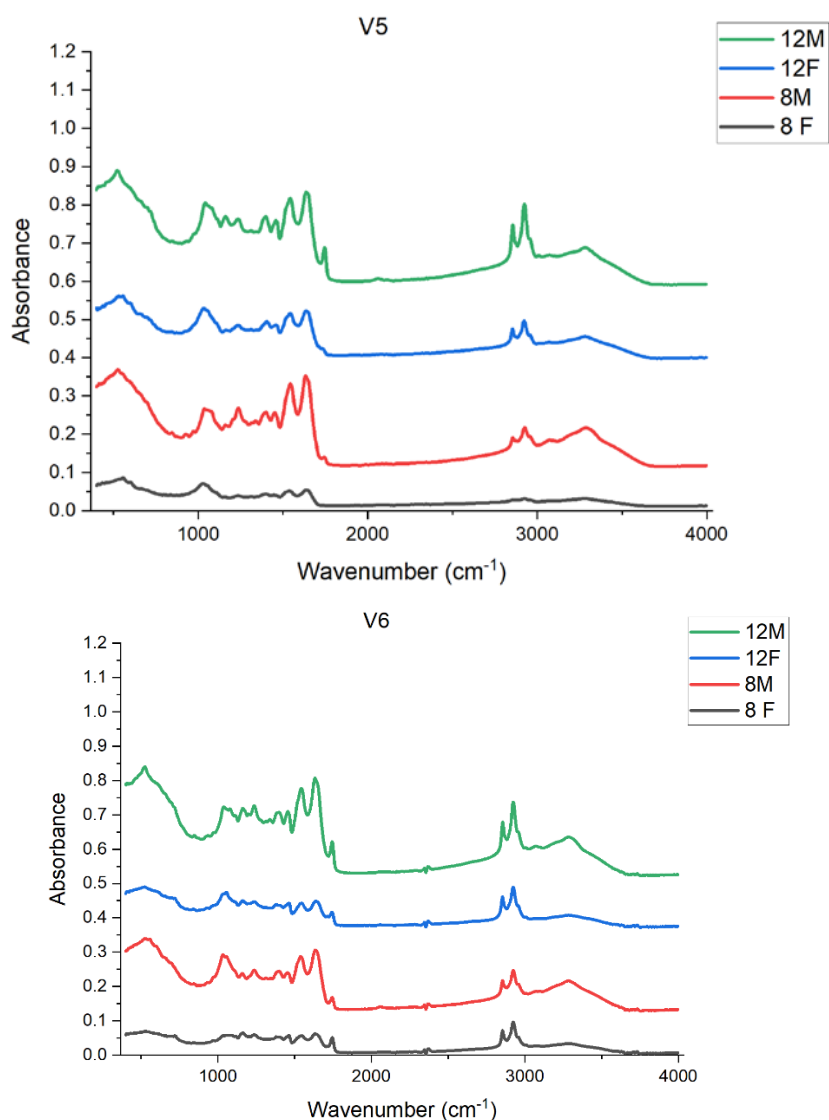


Figura 4. Spectre FTIR ale probelor V4-V6, corespunzătoare materialelor GCK-CG funcționalizate cu BMP, după explantare la 8 și 12 săptămâni.

V5, corespunzătoare concentrației de 0,250% GO-COOH, pare să indice o combinație favorabilă între stabilitatea matricei și apariția semnalelor asociate mineralizării. V6, cu 0,500% GO-COOH, prezintă de asemenea benzi compatibile cu depuneri minerale, dar profilul sugerează o contribuție organică mai pronunțată și o posibilă influență mai mare a încărcării

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

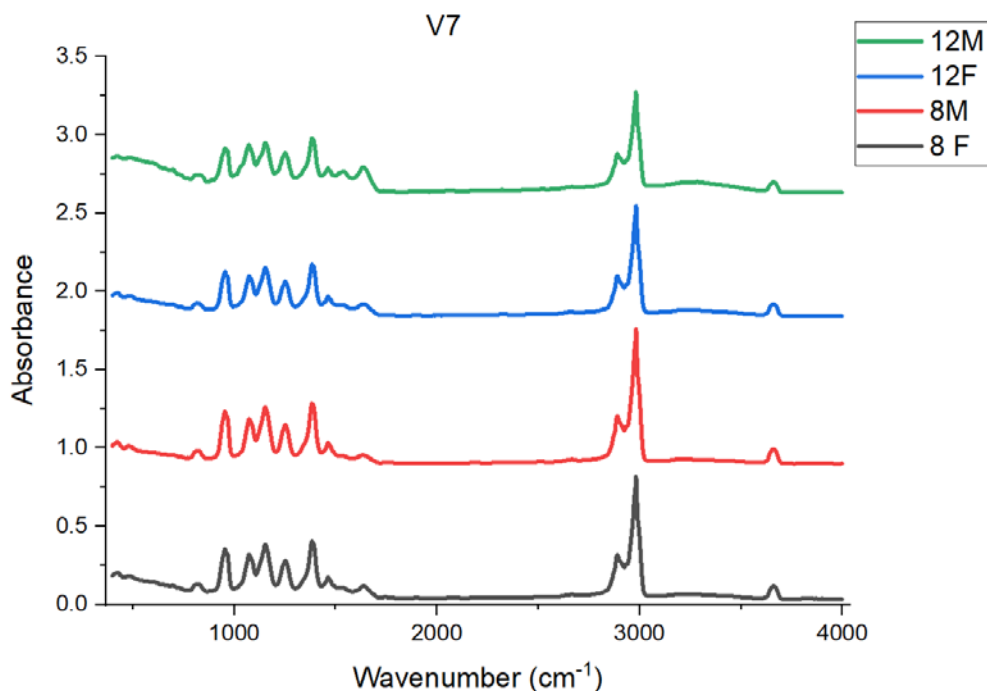
Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

cu GO-COOH asupra organizării chimice a materialului explantat. Astfel, pe baza FTIR, probele V4-V6 confirmă rolul BMP în stimularea formării unei faze minerale, dar intensitatea și claritatea acestui efect pot depinde de concentrația de GO-COOH.

Pentru probele V7-V9, în care BMP este legat covalent prin EDC/NHS, spectrele prezintă un profil diferit față de probele V4-V6. În special la V7 și V8, se observă benzi foarte intense în regiunea $2850-3000\text{ cm}^{-1}$, asociate vibrațiilor C-H, precum și modificări în zona $1000-1600\text{ cm}^{-1}$, ceea ce indică o contribuție organică mai puternică și posibile modificări ale rețelei polimerice după activarea cu EDC/NHS. Aceste semnale pot reflecta prezența legăturilor amidice suplimentare și modificarea chimică a suprafeței materialului. Totuși, semnalele minerale specifice nu sunt la fel de evidente ca în probele V4-V6, ceea ce poate sugera că imobilizarea covalentă a BMP modifică disponibilitatea biologică a factorului osteogenic sau modul în care acesta interacționează cu mediul tisular.



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

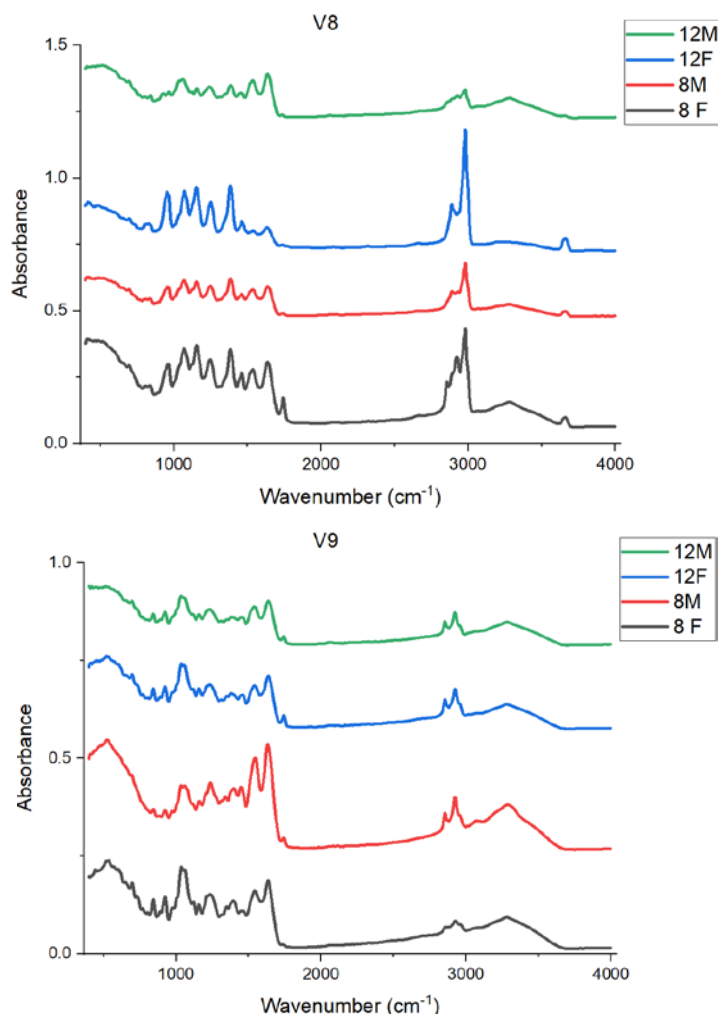


Figura 5. Spectre FTIR ale probelor V7-V9, corespunzătoare materialelor GCK-CG cu BMP imobilizat covalent prin EDC/NHS, după explantare la 8 și 12 săptămâni.

Proba V9, care conține 0,500% GO-COOH și BMP legat covalent, prezintă un profil mai atenuat comparativ cu V7 și V8, cu benzi organice vizibile și semnale moderate în zona 900-1100 cm^{-1} . Totuși, mineralizarea nu apare la fel de clar ca în seria V4-V6. Această observație poate indica faptul că o concentrație mai ridicată de GO-COOH, combinată cu legarea covalentă a BMP, poate influența disponibilitatea grupărilor bioactive și răspunsul local de mineralizare. Comparativ între sexe și timpi de implantare, probele de 12 săptămâni prezintă

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 general spectre mai bine definite decât cele de 8 săptămâni, ceea ce sugerează o evoluție a proceselor de remodelare, degradare parțială a matricei și interacțiune cu țesutul gazdă. Diferențele dintre probele provenite de la animale masculine și feminine sunt vizibile prin variații de intensitate și formă a benzilor, dar acestea trebuie interpretate prudent, deoarece spectrele sunt decalate vertical și pot fi influențate de cantitatea locală de material explantat, gradul de hidratare, țesutul aderent și heterogenitatea zonei de implantare. Per ansamblu, analiza FTIR arată că toate scaffoldurile păstrează semnătura chimică a matricei pe bază de gelatină, k-caragenan și CNF, iar introducerea GO-COOH modifică profilul spectral în funcție de concentrație. Cele mai clare indicii de mineralizare sunt observate pentru probele V4-V6, adică materialele care conțin BMP, ceea ce susține rolul factorului osteogenic în stimularea depunerilor minerale după implantare. În schimb, probele V7-V9, cu BMP legat covalent prin EDC/NHS, prezintă modificări chimice evidente ale componentei organice, dar semnalele asociate mineralizării sunt mai puțin pronunțate. Acest rezultat sugerează că simpla prezență a BMP nu este suficientă, iar modul de imobilizare poate influența disponibilitatea sa biologică și capacitatea scaffoldului de a susține mineralizarea in vivo.

III.3.4. Concluzii

Analiza FTIR a confirmat menținerea semnăturii chimice specifice matricei pe bază de gelatină, κ-caragenan și nanofibrile de celuloză, atât pentru probele pre-implantare, cât și pentru cele post-implantare. Benzile caracteristice grupărilor hidroxil, amină, amidice, carboxilat, sulfat și glicozidice indică păstrarea principalelor componente structurale ale scaffoldurilor. Incorporarea COOH-GO a determinat modificări spectrale dependente de concentrație, fără afectarea structurii generale a matricei hidrogelice. Aceste modificări sugerează existența unor interacțiuni între grafena carboxilată și componentele polimerice ale materialului. Probele funcționalizate cu BMP au prezentat cele mai clare indicii spectrale asociate procesului de mineralizare post-implantare. În special, probele V4-V6 au evidențiat semnale în regiunile $900-1100\text{ cm}^{-1}$ și $1400-1500\text{ cm}^{-1}$, compatibile cu prezența grupărilor

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

fosfat și carbonat, sugerând formarea unor depuneri minerale de tip apatită carbonată. Dintre formulările analizate, proba V5, corespunzătoare concentrației de 0,250% COOH-GO și BMP, pare să prezinte un echilibru favorabil între stabilitatea matricei și apariția semnalelor asociate mineralizării. Această compoziție poate fi considerată promițătoare pentru investigații ulterioare privind regenerarea osoasă. Probele V7-V9, în care BMP a fost imobilizat covalent prin EDC/NHS, au evidențiat modificări chimice ale componentei organice, însă semnalele asociate mineralizării au fost mai puțin pronunțate decât în cazul probelor V4-V6. Acest rezultat sugerează că modul de imobilizare a BMP poate influența disponibilitatea biologică a factorului osteogenic și răspunsul local de mineralizare. În ansamblu, rezultatele FTIR susțin stabilitatea chimică a scaffoldurilor dezvoltate și indică faptul că formulările cu BMP asociat fizic, în special seria V4-V6, prezintă un potențial mai ridicat pentru stimularea mineralizării in vivo. Aceste rezultate justifică analiza complementară prin metode morfologice, imagistice și biologice, precum SEM, micro-CT și histologie.

III.3.5. Bibliografie

- [1] Al-Amin K., Islam M.R., Hossain M.S., et al. *Fourier transform infrared spectroscopic technique for analysis of inorganic materials: a review*. Nanoscale Advances. 2025;7:5980–6013. DOI: 10.1039/D5NA00522A.
- [2] Stuart B.H. *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*. Chichester: John Wiley & Sons; 2004. DOI: 10.1002/0470011149.
- [3] Griffiths P.R. *Fourier transform infrared spectrometry*. Science. 1983;222(4621):297–302. DOI: 10.1126/science.6623077.
- [4] Nakamoto K. *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds. Part A: Theory and Applications in Inorganic Chemistry*. 6th ed. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons; 2009. DOI: 10.1002/9780470405840.
- [5] Kowalczyk D, Pitucha M. Application of FTIR Method for the Assessment of Immobilization of Active Substances in the Matrix of Biomedical Materials. *Materials*. 2019; 12(18):2972. <https://doi.org/10.3390/ma12182972>

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

III.4. Capitolul 4

III.4. Obținerea și caracterizarea dimensională a poliplexilor PEI/ADN și PBAE/ADN pentru sisteme de livrare a acizilor nucleici în cadrul proiectului REOSTEOMi

Activitatea 3. Validarea in vivo a eficienței dispozitivelor REOSTEOMi

Subactivitatea 3.2. Evaluarea in vivo a biodisponibilității substituenților osoși încărcăți cu GO-ASO și a cuștilor ADN la nivel sistemic în modele de șoarece BALB/c cu MM indus

III.4.1. Introducere

În cadrul proiectului REOSTEOMi, Activitatea 3 vizează validarea in vivo a eficienței dispozitivelor dezvoltate, inclusiv prin evaluarea substituenților osoși în modele experimentale relevante pentru complicațiile asociate mielomului multiplu. În acest context, dezvoltarea unor sisteme capabile să complexeze, stabilizeze și transporte acizi nucleici reprezintă o etapă importantă pentru susținerea aplicațiilor biologice și terapeutice urmărite în cadrul proiectului.

Poliplexii sunt sisteme supramoleculare formate prin interacțiuni electrostatice între polimeri cationici și acizi nucleici încărcăți negative [1]. Prin complexare, acizii nucleici pot fi condensați și protejați, ceea ce poate contribui la creșterea stabilității acestora în medii biologice și la facilitarea transportului molecular. În cadrul acestui studiu preliminar, s-a urmărit obținerea și compararea unor poliplexi formați între ADN monocatenar și doi polimeri cationici diferiți: polietilenimină (PEI) și poli(β -amino ester) (PBAE) [2, 3].

ADN-ul monocatenar a fost utilizat ca model de acid nucleic, interacțiunea cu polimerii cationici fiind mediată în principal de grupările fosfat ale scheletului nucleotidic. Pentru

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

sistemul PEI/ADN, complexarea s-a realizat în soluție Trizma base, iar pentru sistemul PBAE/ADN s-a utilizat tampon MES la pH 7, în vederea asigurării unor condiții adecvate de solubilitate, ionizare și formare a poliplexilor [4]. Compararea celor două sisteme permite evaluarea influenței tipului de polimer și a mediului de complexare asupra formării structurilor polimer/ADN.

Prin realizarea acestor experimente în cadrul proiectului, studiul contribuie la fundamentarea dezvoltării unor sisteme de complexare și livrare a acizilor nucleici cu potențială relevanță pentru substituenții osoși încărcăți cu GO-ASO și pentru cuștile ADN. Rezultatele obținute pot sprijini etapele ulterioare de optimizare a stabilității, biodisponibilității și comportamentului sistemic al acestor structuri în modelele in vivo prevăzute în proiect.

III.4.2. Materiale și metode

III.4.2.1. Materiale

În cadrul acestei subactivități au fost realizate experimente preliminare pentru obținerea poliplexilor formați între ADN monocatenar funcționalizat și polimeri cationici, cu scopul de a evalua capacitatea acestora de complexare, stabilizare și potențială livrare a acizilor nucleici. Au fost analizate două sisteme distincte de complexare, respectiv PEI/ADN și PBAE/ADN, utilizând medii tampon ajustate la pH 7. Materialul genetic utilizat a fost un oligonucleotid monocatenar funcționalizat, cu secvența [CarboxyModC5]TCACGATTAGCATTA[6FAM], marcat fluorescent cu 6-FAM și modificat cu grupare carboxil terminală prin linker CarboxyModC5, această secvență fiind specifică mielomului multiplu. Pentru complexare au fost utilizați doi polimeri cationici, polietilenimină (PEI) și poli(β -amino ester) (PBAE). Sistemul PEI/ADN a fost preparat în soluție Trizma base (10mM), iar sistemul PBAE/ADN a fost preparat în tampon MES (10mM). Toate soluțiile utilizate au fost ajustate la pH 7, pentru asigurarea unor condiții comparabile de complexare și pentru menținerea compatibilității cu aplicațiile biologice ulterioare. Pentru fiecare probă s-a utilizat un volum constant de 5.7 μ L ADN monocatenar (1 μ g), în timp ce

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

volumele de PEI, PBAE, Trizma base și MES au fost variate în funcție de raportul de complexare urmărit. Soluțiile de polimer au fost adăugate peste soluția de ADN sub vortexare, pentru a favoriza dispersia rapidă și contactul uniform dintre polimerul cationic și acidul nucleic. După vortexare, probele au fost lăsate timp de 20 de minute la temperatura camerei, pentru desfășurarea procesului de complexare. Procesul de complexare presupune formarea unor structuri supramoleculare stabilizate în principal prin interacțiuni electrostatice între grupările fosfat încărcate negativ ale ADN-ului monocatenar și grupările cationice ale polimerilor utilizați. În urma acestor interacțiuni, ADN-ul poate fi condensat în particule de tip poliplex, ceea ce poate contribui la protejarea sa față de degradare și la facilitarea transportului molecular în aplicații biologice. Timpul de incubare de 20 de minute a fost utilizat pentru stabilizarea acestor interacțiuni și pentru formarea structurilor polimer/ADN înainte de caracterizarea ulterioară.

Prin compararea sistemelor PEI/ADN și PBAE/ADN s-a urmărit evaluarea influenței tipului de polimer și a mediului tampon asupra formării poliplexilor. PEI a fost utilizat ca polimer cationic de referință, datorită capacității ridicate de complexare a acizilor nucleici, în timp ce PBAE a fost analizat ca alternativă polimerică degradabilă, cu potențial pentru aplicații de livrare moleculară.

III.4.2.2. Metodă

Caracterizarea dimensională a complexelor polimer/ADN obținute a fost realizată prin împrăștiere dinamică a luminii (Dynamic Light Scattering, DLS), utilizând un echipament dedicat pentru determinarea dimensiunii hidrodinamice a particulelor în suspensie. Această metodă permite evaluarea diametrului hidrodinamic al poliplexilor formați, prin analiza fluctuațiilor intensității luminii împrăștiată generate de mișcarea browniană a particulelor. Probele PEI/ADN și PBAE/ADN au fost analizate după etapa de complexare, în vederea determinării dimensiunii complexelor și a aprecierii stabilității coloidale preliminare.

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 obținute prin DLS au fost utilizate pentru compararea influenței tipului de polimer, a mediului tampon și a raportului de complexare asupra formării structurilor de tip poliplex.

III.4.3. Rezultate și discuții

În această secțiune sunt prezentate rezultatele preliminare privind formarea și caracterizarea dimensională a poliplexilor PEI/ADN și PBAE/ADN, obținuți la diferite rapoarte N/P, cu scopul de a evalua influența excesului de polimer cationic asupra dimensiunii complexelor și asupra uniformității distribuției dimensionale determinate prin DLS.

Raportul de complexare a fost exprimat ca raport N/P, definit ca raportul molar dintre grupările aminice sau protonabile ale polimerului cationic și grupările fosfat ale ADN-ului monocatenar. Componenta „N” corespunde grupărilor cationice ale polimerului, provenite din PEI sau PBAE, iar componenta „P” corespunde grupărilor fosfat încărcate negativ din scheletul ADN-ului. În cazul oligonucleotidului monocatenar utilizat în acest studiu, cu secvența menționată anterior, secvența nucleotidică propriu-zisă conține 16 baze, astfel că pentru estimarea raportului N/P s-a considerat prezența a 16 grupări fosfat asociate fiecărei molecule de ADN.

Raportul N/P reflectă excesul relativ de polimer cationic față de ADN și reprezintă un parametru important în formarea poliplexilor, deoarece controlează gradul de neutralizare a sarcinilor negative ale ADN-ului, condensarea acestuia și stabilitatea complexelor formate. La rapoarte N/P reduse, cantitatea de polimer poate fi insuficientă pentru complexarea completă a ADN-ului, ceea ce poate conduce la structuri mai mari, mai puțin stabile sau mai polidisperse. În schimb, creșterea raportului N/P determină un exces progresiv de grupări cationice, favorizând interacțiunile electrostatice cu grupările fosfat și formarea unor poliplexi mai compacți.

În acest studiu, volumul de ADN monocatenar a fost menținut constant la 5.7 μL pentru toate probele, iar volumele de PEI sau PBAE au fost ajustate în funcție de raportul N/P urmărit. Volumele de Trizma base, pentru sistemul PEI/ADN, respectiv MES la pH 7, pentru sistemul

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

PBAE/ADN, au fost modificate corespunzător pentru menținerea volumului final constant. Astfel, variația raportului N/P a permis evaluarea influenței cantității de polimer cationic asupra formării, dimensiunii și uniformității

Tabelul 1 prezintă volumele utilizate pentru obținerea poliplexilor PEI/ADN la diferite rapoarte ADN/polimer, precum și caracterizarea dimensională a complexelor formate prin DLS. Volumul de ADN monocatenar a fost menținut constant la 5.7 μ L, în timp ce volumul de PEI a crescut progresiv de la 6.53 μ L la 26.10 μ L, corespunzător creșterii raportului ADN/polimer de la 5 la 20. Volumul de Trizma base a fost ajustat corespunzător, astfel încât volumul final al fiecărei probe să fie menținut constant la 100 μ L.

Tabel 1. Volumele utilizate pentru formarea poliplexilor PEI/ADN și caracterizarea dimensională a acestora prin DLS în funcție de raportul ADN/polimer.

Raport ADN/Polimer	Volum ADN (μ L)	Volum PEI(μ L)	Volum Trizma base buffer(μ L)	Dimensiune complex (mărimea medie a poliplexilor PEI/ADN) nm	PDI (uniformitatea distribuției dimensionale)
5	5.7	6.53	87.77	964.5 $\pm$ 22.27	0.48 $\pm$ 0.031
7	5.7	9.14	85.2	161.4 $\pm$ 2.46	0.189 $\pm$ 0.013
10	5.7	13.05	81.25	139.3 $\pm$ 3.91	0.232 $\pm$ 0.009
15	5.7	19.60	74.7	163.9 $\pm$ 8.065	0.159 $\pm$ 0.014
20	5.7	26.10	68.20	165.7 $\pm$ 7.67	0.302 $\pm$ 0.036

Rezultatele DLS arată că raportul ADN/polimer influențează semnificativ dimensiunea complexelor PEI/ADN și uniformitatea distribuției dimensionale. La raportul 5, complexe au prezentat o dimensiune medie foarte mare, de 964.5 $\pm$ 22.27 nm, asociată cu un PDI de 0.48 $\pm$ 0.031. Această valoare ridicată a PDI indică o distribuție dimensională neuniformă, sugerând formarea unor agregate sau o complexare incomplet stabilizată la această proporție de PEI. Creșterea raportului la 7 a determinat o reducere accentuată a dimensiunii complexelor, până la 161.4 $\pm$ 2.46 nm, concomitent cu scăderea PDI la 0.189 $\pm$ 0.013. Acest rezultat indică

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

formarea unor poliplexi mai compacți și mai uniform distribuiți dimensional. Un comportament similar a fost observat și pentru raportul 10, unde dimensiunea medie a fost de 139.3 ± 3.91 nm, cu un PDI de 0.232 ± 0.009 , ceea ce confirmă menținerea unor complexe de dimensiuni nanometrice.

Raportul 15 a prezentat una dintre cele mai favorabile distribuții dimensionale, cu o dimensiune medie de 163.9 ± 8.065 nm și cel mai redus PDI dintre probele analizate, respectiv 0.159 ± 0.014 . Acest lucru sugerează o populație relativ omogenă de poliplexi și o complexare eficientă între PEI și ADN. La raportul 20, dimensiunea complexelor s-a menținut în același interval, 165.7 ± 7.67 nm, însă PDI a crescut la 0.302 ± 0.036 , indicând o distribuție dimensională mai largă, posibil ca urmare a excesului de polimer cationic și a tendinței de asociere secundară între complexe. În ansamblu, rezultatele indică faptul că rapoartele ADN/polimer cuprinse între 7 și 15 favorizează formarea unor poliplexi PEI/ADN cu dimensiuni reduse și distribuție dimensională mai uniformă. Dintre acestea, raportul 15 pare să ofere cel mai echilibrat profil, datorită PDI-ului scăzut și dimensiunii medii situate în intervalul nanometric. Raportul 5 este mai puțin favorabil, fiind asociat cu agregare și polidispersitate ridicată, iar raportul 20 necesită interpretare prudentă din cauza creșterii PDI.

În cazul sistemului PBAE/ADN, raporturile de complexare au fost exprimate ca rapoarte masice ADN/polimer, spre deosebire de sistemul PEI/ADN, unde s-a utilizat raportul N/P. Această abordare a fost aleasă deoarece PEI este un polimer cationic bine definit din punctul de vedere al densității de grupări aminice protonabile, ceea ce permite estimarea raportului molar dintre grupările aminice ale polimerului și grupările fosfat ale ADN-ului. Astfel, pentru PEI, raportul N/P poate fi calculat mai direct și este utilizat frecvent pentru descrierea complexării acizilor nucleici. În cazul PBAE, calcularea unui raport N/P exact poate fi mai dificilă, deoarece numărul efectiv de grupări protonabile disponibile pentru interacțiunea cu ADN-ul depinde de structura polimerului, gradul de protonare la pH 7, masa moleculară, polidispersitatea și eventualele variații ale lotului de sinteză. Din acest motiv, exprimarea

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

complexării prin raport masic ADN/PBAE oferă o metodă mai practică și reproductibilă pentru prepararea probelor, permițând compararea directă a efectului cantității de PBAE asupra dimensiunii și uniformității poliplexilor. Prin urmare, raporturile masice ADN/PBAE au fost utilizate pentru a controla cantitatea de polimer adăugată la un volum constant de ADN monocatenar, menținând totodată volumul final al probelor constant. Această strategie permite evaluarea influenței concentrației relative de PBAE asupra formării, compactării și stabilității coloidale a poliplexilor, fără a introduce incertitudini suplimentare asociate estimării numărului exact de grupări cationice active.

Pentru obținerea poliplexilor PBAE/ADN tabelul 2 arată rapoartele ADN/polimer, precum și caracterizarea dimensională a complexelor formate prin DLS. Volumul de ADN monocatenar a fost menținut constant la 5.7 μL pentru toate probele, în timp ce volumul de PBAE a fost variat între 50 μL și 2.5 μL , în funcție de raportul ADN/polimer urmărit. Volumul de tampon MES a fost ajustat corespunzător, astfel încât volumul final al fiecărei probe să fie menținut constant la 100 μL . Utilizarea tamponului MES la pH 7 a permis realizarea complexării în condiții controlate, compatibile cu stabilitatea sistemelor polimer/ADN analizate. Rezultatele obținute prin DLS indică faptul că sistemele PBAE/ADN formează complexe cu dimensiuni medii situate predominant în intervalul 100-140 nm, ceea ce sugerează obținerea unor poliplexi de dimensiuni nanometrice și relativ bine controlați. La raportul 1/100, unde volumul de PBAE utilizat a fost cel mai mare, complexe au prezentat o dimensiune medie de 141.4 ± 0.8 nm și un PDI de 0.169 ± 0.015 . Această valoare indică formarea unor particule relativ uniforme, fără o polidispersitate ridicată, deși dimensiunea este ușor mai mare comparativ cu unele dintre rapoartele cu volum mai redus de PBAE.

Pe măsură ce volumul de PBAE scade, se observă o tendință generală de reducere a dimensiunii complexelor. Astfel, pentru rapoartele 1/90, 1/80 și 1/70, dimensiunile medii au fost de 131.2 ± 1.79 nm, 139 ± 0.5 nm și, respectiv, 124.7 ± 0.81 nm, cu valori PDI apropiate, cuprinse între 0.171 și 0.186. Aceste rezultate indică o distribuție dimensională relativ uniformă

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

și sugerează că reducerea moderată a cantității de PBAE nu compromite formarea poliplexilor, ci poate contribui la obținerea unor complexe mai compacte.

Tabel 2. Volumele utilizate pentru formarea poliplexilor PBAE/ADN și caracterizarea dimensională a acestora prin DLS în funcție de raportul ADN/polimer.

Raport ADN/Polimer	Volum ADN (μL)	Volum PBAE(μL)	Volum Mes buffer (μL)	Dimensiune complex (mărimea medie a poliplexilor PEI/ADN) nm	PDI (uniformitatea distribuției dimensionale)
1/100	5.7	50	44.3	141.4±0.8	0.169±0.015
1/90	5.7	45	49.3	131.2±1.79	0.171±0.017
1/80	5.7	40	54.3	139±0.5	0.186±0.003
1/70	5.7	35	59.3	124.7±0.81	0.171±0.011
1/60	5.7	30	64.3	115.5±0.87	0.180±0.014
1/50	5.7	25	69.3	111.5±0.50	0.185±0.003
1/40	5.7	20	74.3	107.2±0.76	0.167±0.007
1/30	5.7	15	79.3	115.4±2.59	0.187±0.019
1/20	5.7	10	84.3	101.7±0.97	0.156±0.006
1/10	5.7	5	89.3	97.94±1.65	0.219±0.018
1/5	5.7	2.5	94.3	109.6±1.00	0.262±0.031

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 rapoartele intermediare 1/60, 1/50 și 1/40, dimensiunea complexelor continuă să scadă, ajungând la 115.5 ± 0.87 nm, 111.5 ± 0.50 nm și, respectiv, 107.2 ± 0.76 nm. Valorile PDI au rămas reduse, între 0.167 și 0.185, ceea ce indică o bună uniformitate dimensională a probelor. Dintre acestea, raportul 1/40 prezintă un profil favorabil, prin asocierea unei dimensiuni reduse, de aproximativ 107 nm, cu un PDI de 0.167 ± 0.007 , sugerând formarea unei populații relativ omogene de poliplexi.

La raportul 1/30, dimensiunea medie a crescut ușor la 115.4 ± 2.59 nm, iar PDI-ul a fost de 0.187 ± 0.019 . Această variație moderată poate reflecta modificări ale echilibrului electrostatic dintre PBAE și ADN, însă distribuția dimensională rămâne acceptabilă. Raportul 1/20 a condus la una dintre cele mai bune combinații dintre dimensiune și uniformitate, cu o dimensiune medie de 101.7 ± 0.97 nm și cel mai mic PDI dintre probele analizate, respectiv 0.156 ± 0.006 . Acest rezultat sugerează formarea unor complexe compacte și bine distribuite dimensional.

Pentru rapoartele cu cele mai mici volume de PBAE, respectiv 1/10 și 1/5, se observă o modificare a comportamentului sistemului. Raportul 1/10 a condus la cea mai mică dimensiune medie a complexelor, de 97.94 ± 1.65 nm, însă PDI-ul a crescut la 0.219 ± 0.018 , indicând o distribuție dimensională mai largă. La raportul 1/5, dimensiunea medie a crescut la 109.6 ± 1.00 nm, iar PDI-ul a ajuns la 0.262 ± 0.031 , valoare care sugerează o polidispersitate mai ridicată comparativ cu rapoartele intermediare. Această creștere a PDI poate indica o complexare mai puțin uniformă, posibil determinată de cantitatea mai redusă de polimer disponibilă pentru interacțiunea cu ADN-ul.

În ansamblu, rezultatele arată că PBAE formează poliplexi PBAE/ADN cu dimensiuni nanometrice și distribuții dimensionale relativ uniforme pentru majoritatea rapoartelor analizate. Cele mai favorabile rezultate au fost observate pentru rapoartele intermediare, în special 1/40 și 1/20, unde dimensiunile complexelor au fost reduse, iar valorile PDI au indicat o bună omogenitate. Rapoartele 1/10 și 1/5, deși au condus la complexe de dimensiuni mici,

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

au prezentat valori PDI mai mari, sugerând o distribuție mai puțin uniformă. Aceste date indică faptul că raportul ADN/PBAE influențează atât dimensiunea hidrodinamică, cât și uniformitatea poliplexilor, iar optimizarea raportului de complexare este esențială pentru obținerea unor sisteme stabile și reproductibile pentru aplicații de livrare a acizilor nucleici.

Tabelul 3 prezintă caracterizarea dimensională prin DLS a poliplexilor PBAE/ADN după două ore de complexare, în funcție de raportul ADN/polimer. Volumul de ADN monocatenar a fost menținut constant la 5.7 μL , iar volumul de PBAE a fost variat între 50 μL și 2.5 μL . Volumul de tampon MES a fost ajustat corespunzător pentru menținerea unui volum final constant de 100 μL . Comparativ cu evaluarea inițială, analiza după două ore permite aprecierea stabilității dimensionale a complexelor formate și evidențierea eventualelor procese de reorganizare, compactare sau agregare în timp. Rezultatele arată că, pentru rapoartele cu volum mai mare sau intermediar de PBAE, respectiv 1/100, 1/90, 1/80, 1/70, 1/60, 1/50 și 1/40, dimensiunile complexelor au rămas în general stabile, fiind cuprinse între aproximativ 110 și 142 nm. Aceste valori sunt apropiate de cele obținute după etapa inițială de complexare, ceea ce sugerează că poliplexii PBAE/ADN formați în aceste condiții își mențin stabilitatea dimensională în primele două ore. De exemplu, raportul 1/100 a prezentat o dimensiune medie de 142.2 ± 2.08 nm, foarte apropiată de valoarea inițială, iar raportul 1/80 a rămas practic neschimbat, cu o dimensiune de 138.7 ± 1.05 nm. Acest comportament indică faptul că, la aceste rapoarte, complexarea dintre PBAE și ADN este suficient de stabilă pentru a preveni modificări majore ale dimensiunii hidrodinamice.

Pentru rapoartele 1/60, 1/50 și 1/40, valorile dimensiunii medii au fost de 115.9 ± 0.8 nm, 113.3 ± 0.705 nm și, respectiv, 110.3 ± 0.58 nm. Aceste rezultate indică menținerea unor complexe nanometrice compacte, cu variații reduse între măsurători. Valorile PDI pentru aceste probe rămân scăzute sau moderate, ceea ce sugerează o distribuție dimensională relativ uniformă. Astfel, aceste rapoarte pot fi considerate favorabile din punctul de vedere 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

stabilității coloidale preliminare, deoarece dimensiunea complexelor nu se modifică semnificativ după două ore de incubare.

Tabel 3. Volumele utilizate pentru formarea poliplexilor PBAE/ADN și caracterizarea dimensională a acestora prin DLS în funcție de raportul ADN/polimer după două ore de complexare.

Raport ADN/Polimer	Volum ADN (μL)	Volum PBAE(μL)	Volum Mes buffer (μL)	Dimensiune complex (mărimea medie a poliplexilor PEI/ADN) nm	PDI (uniformitatea distribuției dimensionale)
1/100	5.7	50	44.3	142.2±2.08	0.182±0.005
1/90	5.7	45	49.3	137.7±0.6	0.193±0.003
1/80	5.7	40	54.3	138.7±1.05	0.190±0.015
1/70	5.7	35	59.3	123.4±1.42	0.192±0.005
1/60	5.7	30	64.3	115.9±0.8	0.173±0.008
1/50	5.7	25	69.3	113.3±0.705	0.175±0.2
1/40	5.7	20	74.3	110.3±0.58	0.171±0.022
1/30	5.7	15	79.3	132.8±1.60	0.255±0.014
1/20	5.7	10	84.3	105.9±1.38	0.2±0.11
1/10	5.7	5	89.3	107.6±0.41	0.296±0.032
1/5	5.7	2.5	94.3	145.1±0.031	0.435±0.023

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

La raportul 1/30 se observă o creștere a dimensiunii medii la 132.8 ± 1.60 nm, comparativ cu valoarea inițială de aproximativ 115 nm. În același timp, PDI-ul crește la 0.255 ± 0.014 , ceea ce indică o distribuție dimensională mai largă. Această modificare poate sugera o reorganizare parțială a complexelor în timp sau apariția unor asocieri secundare între poliplexi. Deși dimensiunea rămâne în domeniul nanometric, creșterea PDI indică o scădere a uniformității probei după două ore de complexare. Pentru raportul 1/20, dimensiunea medie a complexelor a fost de 105.9 ± 1.38 nm, iar PDI-ul a fost de aproximativ 0.200, ceea ce indică menținerea unei populații de poliplexi relativ compacte. Această probă rămâne una dintre variantele favorabile, deoarece dimensiunea este redusă, iar distribuția dimensională este încă acceptabilă. Comparativ cu rapoartele cu volum mai mic de PBAE, raportul 1/20 pare să păstreze un echilibru mai bun între compactarea complexelor și uniformitatea distribuției. În cazul rapoartelor 1/10 și 1/5, se observă o creștere mai evidentă a polidispersității după două ore. Raportul 1/10 prezintă o dimensiune medie de 107.6 ± 0.41 nm, dar PDI-ul crește la 0.296 ± 0.032 , indicând o distribuție dimensională mai puțin omogenă. La raportul 1/5, modificarea este mai pronunțată, dimensiunea medie crescând la 145.1 ± 0.031 nm, iar PDI-ul ajungând la 0.435 ± 0.023 . Această valoare ridicată a PDI sugerează apariția unei populații polidisperse, posibil asociată cu agregare parțială sau complexare insuficient stabilizată din cauza cantității reduse de PBAE disponibile pentru interacțiunea cu ADN-ul. În ansamblu, rezultatele obținute după două ore de complexare indică faptul că majoritatea poliplexilor PBAE/ADN își mențin dimensiunile în domeniul nanometric, ceea ce sugerează o stabilitate dimensională bună pe termen scurt. Rapoartele cuprinse între 1/100 și 1/40 au prezentat cele mai stabile profile dimensionale, cu valori PDI reduse sau moderate, indicând formarea unor complexe relativ omogene. Raportul 1/20 rămâne, de asemenea, favorabil, prin dimensiunea redusă și distribuția acceptabilă. În schimb, rapoartele 1/10 și mai ales 1/5 indică o tendință de creștere a polidispersității după două ore, ceea ce sugerează că reducerea excesivă a cantității de PBAE poate afecta stabilitatea coloidală a poliplexilor. Prin urmare, datele sugerează că poliplexii

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

PBAE/ADN au rămas în general stabili după două ore de complexare, în special pentru rapoartele intermediare și ridicate de PBAE. Totuși, pentru rapoartele cu volum redus de polimer, creșterea PDI indică necesitatea unor optimizări suplimentare și a unor evaluări de stabilitate extinse, pentru identificarea raportului optim de complexare.

III.4.4. Concluzii și discuții

Rezultatele obținute prin DLS au evidențiat faptul că atât PEI, cât și PBAE pot forma complexe de tip poliplex cu ADN-ul monocatenar funcționalizat, însă comportamentul dimensional și gradul de uniformitate al particulelor au fost influențate de tipul polimerului, de raportul de complexare și de timpul de incubare. În toate experimentele, volumul de ADN a fost menținut constant la 5.7 μL , iar volumele de polimer și tampon au fost ajustate pentru menținerea unui volum final constant, ceea ce a permis compararea efectului cantității relative de polimer asupra formării complexelor. În cazul sistemului PEI/ADN, variația raportului N/P a influențat semnificativ dimensiunea poliplexilor. La raportul N/P 5, complexe au prezentat o dimensiune medie foarte mare, de aproximativ 964.5 nm, asociată cu un PDI de 0.48, ceea ce indică o distribuție dimensională largă și posibilă agregare. Acest rezultat sugerează că, la un raport redus de PEI, cantitatea de grupări aminice disponibile nu este suficientă pentru condensarea eficientă și uniformă a ADN-ului monocatenar. Prin creșterea raportului N/P la 7, dimensiunea complexelor a scăzut abrupt la aproximativ 161.4 nm, iar PDI-ul a scăzut la 0.189, indicând formarea unor poliplexi mai compacți și mai omogeni. Această tendință s-a menținut și pentru rapoartele N/P 10 și 15, unde dimensiunile au rămas în intervalul 139.3-163.9 nm, cu valori PDI reduse sau moderate.

Dintre rapoartele PEI/ADN analizate, N/P 15 a prezentat cel mai favorabil profil, având o dimensiune medie de aproximativ 163.9 nm și cel mai mic PDI, respectiv 0.159. Acest rezultat sugerează o complexare eficientă și o distribuție dimensională relativ uniformă. La raportul N/P 20, dimensiunea complexelor a rămas apropiată, aproximativ 165.7 nm, însă PDI-ul a crescut la 0.302, ceea ce indică o distribuție mai largă. Această creștere poate fi asociată

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

cu excesul de PEI, care poate favoriza interacțiuni secundare între poliplexi sau apariția unor populații dimensionale diferite. Astfel, pentru sistemul PEI/ADN, rapoartele N/P 7-15 par mai adecvate pentru obținerea unor complexe nanometrice, iar raportul N/P 15 poate fi considerat cel mai echilibrat dintre cele evaluate.

Pentru sistemul PBAE/ADN, caracterizarea inițială a arătat formarea unor poliplexi cu dimensiuni mai reduse și mai constante comparativ cu PEI/ADN. Dimensiunile complexelor au fost cuprinse în general între 97.94 și 141.4 nm, iar valorile PDI au rămas predominant sub 0.20 pentru majoritatea rapoartelor testate. Acest comportament indică o capacitate bună a PBAE de a forma particule nanometrice relativ omogene cu ADN-ul monocatenar. Rapoartele intermediare au prezentat cele mai bune rezultate, în special 1/40 și 1/20, pentru care dimensiunile medii au fost de aproximativ 107.2 nm, respectiv 101.7 nm, cu valori PDI de 0.167 și 0.156. Aceste date sugerează formarea unor poliplexi compacți, cu distribuție dimensională uniformă.

Comparativ cu PEI, sistemul PBAE/ADN a prezentat o stabilitate dimensională inițială mai bună pe un interval mai larg de rapoarte. În timp ce PEI a generat particule foarte mari și polidisperse la raportul N/P 5, PBAE a format complexe nanometrice chiar și la rapoarte cu volume diferite de polimer. Totuși, la rapoartele PBAE/ADN cu volum mai redus de polimer, respectiv 1/10 și 1/5, PDI-ul a crescut la 0.219 și 0.262, indicând o tendință de lărgire a distribuției dimensionale. Această observație sugerează că reducerea excesivă a cantității de PBAE poate afecta uniformitatea complexării, chiar dacă dimensiunea medie rămâne în domeniul nanometric.

Analiza poliplexilor PBAE/ADN după două ore de complexare a evidențiat faptul că majoritatea probelor au rămas stabile dimensional pe termen scurt. Pentru rapoartele 1/100-1/40, dimensiunile au rămas în general apropiate de valorile inițiale, fiind cuprinse între aproximativ 110 și 142 nm, iar valorile PDI s-au menținut în domeniul redus sau moderat. Acest rezultat indică faptul că, pentru aceste rapoarte, complexe PBAE/ADN nu prezintă

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

modificări majore de dimensiune după două ore, ceea ce sugerează o stabilizare a structurilor formate. Rapoartele 1/60, 1/50 și 1/40 au rămas deosebit de constante, cu dimensiuni de aproximativ 115.9 nm, 113.3 nm și 110.3 nm, indicând menținerea unor particule compacte.

Totuși, la rapoartele cu volum mai mic de PBAE s-a observat o creștere mai evidentă a polidispersității după două ore. Raportul 1/30 a crescut la aproximativ 132.8 nm, cu un PDI de 0.255, ceea ce sugerează o reorganizare parțială a complexelor sau o asociere secundară între particule. Raportul 1/10 a păstrat o dimensiune medie relativ redusă, de aproximativ 107.6 nm, dar PDI-ul a crescut la 0.296, indicând o distribuție mai puțin uniformă. Cea mai pronunțată modificare a fost observată pentru raportul 1/5, unde dimensiunea medie a crescut la aproximativ 145.1 nm, iar PDI-ul a ajuns la 0.435, valoare care indică o polidispersitate ridicată și posibilă agregare. Prin urmare, rapoartele cu cantitate prea mică de PBAE par mai puțin stabile în timp.

Comparativ între cele două sisteme, PEI/ADN a prezentat o dependență mai accentuată de raportul N/P, cu o tranziție clară de la agregate mari la raport redus către poliplexi nanometrici la rapoarte mai mari. PBAE/ADN, în schimb, a format complexe mai mici și mai uniforme încă de la evaluarea inițială, cu o stabilitate bună după două ore pentru rapoartele cu volum suficient de polimer. Din punct de vedere dimensional, PBAE a generat, în general, complexe mai reduse ca dimensiune decât PEI, în special pentru rapoartele intermediare. Din punct de vedere al uniformității, cele mai mici valori PDI au fost observate pentru PEI/ADN la N/P 15 și pentru PBAE/ADN la raportul 1/20, ceea ce indică faptul că ambele sisteme pot genera poliplexi relativ omogeni atunci când raportul de complexare este optimizat.

În concluzie, rezultatele preliminare indică faptul că raportul de complexare reprezintă un parametru critic pentru controlul dimensiunii și uniformității poliplexilor formați. Pentru sistemul PEI/ADN, raportul N/P 15 pare cel mai favorabil dintre cele analizate, datorită PDI-ului scăzut și dimensiunii nanometrice stabile. Pentru sistemul PBAE/ADN, rapoartele 1/40 și 1/20 au prezentat cele mai bune caracteristici inițiale, iar după două ore, rapoartele 1/60-1/40

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

au indicat o stabilitate dimensională bună. Rapoartele cu volum prea redus de PBAE, în special 1/5, au fost asociate cu polidispersitate crescută după două ore, sugerând o stabilitate coloidală mai redusă.

Aceste rezultate susțin utilizarea PEI și PBAE ca polimeri cationici pentru complexarea ADN-ului monocatenar, însă indică necesitatea optimizării raportului ADN/polimer pentru fiecare sistem. În etapa următoare, caracterizarea dimensională trebuie completată prin determinarea potențialului zeta, evaluarea stabilității în medii biologice relevante, analiza eficienței de complexare și studii de biocompatibilitate. Aceste investigații vor permite selectarea formulărilor cu dimensiune adecvată, distribuție uniformă și stabilitate suficientă pentru aplicații ulterioare în livrarea acizilor nucleici și în evaluarea substituenților osoși încărcăți cu GO-ASO, în contextul Activității 3 din proiect.

III.4.5. Bibliografie

- [1] Winkeljann, B., Keul, D. C., & Merkel, O. M. (2022). Engineering poly- and micelleplexes for nucleic acid delivery – A reflection on their endosomal escape. *Journal of Controlled Release*, 353, 518. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.12.008>
- [2] Benjaminsen, R. V., Matthebjerg, M. A., Henriksen, J. R., Moghimi, S. M., & Andresen, T. L. (2012). The Possible “Proton Sponge ” Effect of Polyethylenimine (PEI) Does Not Include Change in Lysosomal pH. *Molecular Therapy*, 21(1), 149. <https://doi.org/10.1038/mt.2012.185>
- [3] Zhang, J., Cai, X., Dou, R., Guo, C., Tang, J., Hu, Y., Chen, H., & Chen, J. (2023). Poly(β -amino ester)s-based nanovehicles: Structural regulation and gene delivery. *Molecular Therapy. Nucleic Acids*, 32, 568. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2023.04.019>
- [4] Eltoukhy, A. A., Siegwart, D. J., Alabi, C. A., Rajan, J. S., Langer, R., & Anderson, D. G. (2012). Effect of molecular weight of amine end-modified poly(β -amino ester)s on gene delivery efficiency and toxicity. *Biomaterials*, 33(13), 3594. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.01.046>

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

III.5. Capitolul 5

III.5. Evaluarea biocompatibilității structurilor din gelatină, K-carragenan, nanofibre de celuloză și COOH-GO, prin testare Live/Dead

Dezvoltarea biomaterialelor destinate aplicațiilor de inginerie tisulară presupune nu doar obținerea unor proprietăți structurale și mecanice adecvate, ci și asigurarea unei interacțiuni favorabile cu celulele. Capacitatea unui material de a susține adeziunea, proliferarea și organizarea celulară reprezintă un criteriu esențial pentru evaluarea potențialului său în medicina regenerativă. În acest context, caracterizarea răspunsului celular oferă informații relevante privind biocompatibilitatea și funcționalitatea biomaterialelor, contribuind la optimizarea compoziției și arhitecturii acestora pentru aplicații biomedicale specifice [1], [2].

Evaluarea biocompatibilității scaffold-urilor utilizând fibroblaste NIH-3T3 reprezintă o metodă de validare preliminară a biomaterialelor destinate aplicațiilor de inginerie tisulară. Această linie celulară este frecvent utilizată datorită stabilității sale biologice, capacității ridicate de proliferare și sensibilității la modificările mediului extracelular. Fibroblastele joacă un rol esențial în procesele de regenerare tisulară prin sinteza și remodelarea matricei extracelulare, ceea ce le transformă într-un model relevant pentru investigarea interacțiunilor dintre celule și biomateriale. Testele de viabilitate efectuate pe celule NIH-3T3 permit evaluarea efectelor potențial citotoxice ale materialelor, precum și aprecierea capacității acestora de a susține adeziunea, răspândirea și supraviețuirea celulară [3].

În ultimii ani, metodele de analiză celulară au evoluat de la simple determinări cantitative ale viabilității către abordări complexe care permit investigarea morfologiei, distribuției și comportamentului celulelor în cadrul suporturilor tridimensionale. Tehnicile de microscopie cu fluorescență, inclusiv testele de tip Live/Dead, oferă posibilitatea evaluării

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

simultane a viabilității și a organizării celulare, furnizând date importante privind compatibilitatea dintre celule și materialul suport. Aceste analize permit evidențierea efectelor pe care caracteristicile biomaterialului le exercită asupra răspunsului biologic încă din etapele timpurii ale culturii celulare [4], [5].

În cadrul prezentului studiu au fost evaluate scaffold-uri cu compoziții diferite, dezvoltate pentru a crea un mediu favorabil creșterii și dezvoltării celulare. Au fost investigate structuri pe bază de gelatină, K-carragenan, nanofibre de celuloză (CNF) și oxid de grafenă funcționalizat cu grupări carboxil (COOH-GO), urmărindu-se impactul acestor componente asupra comportamentului celular. Analiza a fost realizată după 24 de ore de cultură celulară, utilizând testul Live/Dead pentru evaluarea viabilității și distribuției celulelor în cadrul scaffold-urilor.

III.5.2. Matertiale și metode

III.5.2.1. Materiale

Cultura celulară NIH-3T3 (CLS Cell Lines Service GmbH, Heidelberg, Germania) a fost utilizată pentru toate experimentele. Aceasta a fost cultivată în mediu Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Ham's F12 (1:1), Cytion, Heidelberg, Germania), cu 10% ser fetal bovin (FBS; Gibco™, Thermo Fisher Scientific) și 1% soluție de Penicilină-Streptomicină 100× (Gibco™, Thermo Fisher Scientific). Pentru evaluarea răspunsului celular s-a utilizat kitul comercial Live/Dead Viability/Cytotoxicity Kit, for mammalian cells achiziționat de la Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, SUA). Soluția de tampon fosfat salin (PBS) a fost furnizată de Sigma Aldrich Merck (Darmstadt, Germany), iar tripsina de Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, SUA)

III.5.2.1. Însămânțarea celulelor și pregătirea probelor

Pentru evaluarea interacțiunilor dintre celule și biomaterial, au fost selectate câte o probă pentru fiecare tip de structură, acestea fiind ulterior plasate în plăci Petri. Acestea au fost introduse într-o hotă cu flux laminar vertical pentru menținerea mediului aseptice și supuse unui

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

proces de sterilizare cu radiații UV, timp de o oră pentru fiecare suprafață. Pentru obținerea suspensiei celulare necesare experimentelor, celulele aderente au fost detașate enzimatic utilizând tripsină. În prealabil, mediul de cultură a fost îndepărtat din recipientele de cultivare, iar suprafața celulară a fost spălată de două ori cu PBS, pentru eliminarea urmelor de ser care ar putea inhiba activitatea enzimei. Ulterior, s-a adăugat soluția de tripsină, iar probele au fost incubate timp de aproximativ 3 minute, până la desprinderea completă a celulelor de pe substratul de cultură. Reacția enzimatică a fost oprită prin adăugarea mediului complet de cultură, iar suspensia celulară obținută a fost omogenizată prin pipetare repetată pentru a asigura dispersia uniformă a celulelor. Suspensia a fost transferată într-un tub conic de 50 ml și centrifugată la 1300 rpm timp de 3 minute pentru sedimentarea celulelor. După centrifugare, supernatantul a fost îndepărtat cu atenție, păstrându-se sedimentul celular pentru etapele ulterioare ale experimentului. Celulele astfel detașate au fost resuspendate în 1 ml de mediu complet, iar densitatea celulară a fost determinată prin metoda colorării cu albastru tripan. Suspensia celulară a fost ulterior ajustată prin diluție până la atingerea concentrației dorite, iar pe fiecare probă au fost însămânțate 100 000 de celule. Plăcile au fost incubate în condiții standard, în prezența a 2 ml/placă de mediu complet, asigurându-se astfel un contact adecvat între celule și biomaterial. Viabilitatea celulară a fost evaluată după 24 de ore de cultură.

III.5.2.2. Evaluarea viabilității celulare prin marcare Live/Dead la 24 de ore

Evaluarea viabilității celulelor după contactul direct cu scaffold-urile a fost realizat prin intermediul testului Live/Dead, o metodă fluorescentă utilizată frecvent pentru aprecierea biocompatibilității biomaterialelor și pentru diferențierea celulelor viabile de cele neviabile. Principiul metodei se bazează pe utilizarea a doi coloranți fluorescenți complementari: Calcein AM, care marchează celulele viabile prin emiterea unei fluorescențe verzi în urma activității esterazelor intracelulare, și Ethidium homodimer-1, care pătrunde exclusiv în celulele cu membrană compromisă și evidențiază nucleii acestora prin fluorescență roșie.

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 vederea efectuării testului, soluția PBS a fost încălzită la 37°C, iar reactivii kitului au fost încălziți la temperatura camerei înainte de utilizare. Pentru a preveni fotodegradarea coloranților și pentru a asigura stabilitatea semnalului fluorescent, toate etapele de preparare și incubare au fost efectuate în condiții de lumină redusă. Soluția de lucru a fost preparată prin amestecarea a 10 ml PBS cu 5 μ l Calcein AM și 20 μ l Ethidium homodimer-1. După îndepărtarea mediului de cultură, probele au fost spălate de două ori cu PBS pentru eliminarea reziduurilor care ar putea interfera cu procesul de colorare. Ulterior, în fiecare godeu a fost adăugat câte 1 ml din soluția de colorare, iar plăcile au fost incubate timp de 40 de minute în întuneric, pentru a permite pătrunderea și distribuția uniformă a coloranților la nivel celular.

La finalul perioadei de incubare, soluția de marcarea a fost îndepărtată, iar probele au fost spălate ușor și menținute în PBS până la analiza microscopică. Observațiile au fost efectuate utilizând un microscop de fluorescență Dmi8 Leica (Germania), echipat cu filtre specifice pentru detectarea fluorescenței verzi și roșii. Imaginile obținute au permis evaluarea distribuției celulelor pe suprafața biomaterialelor, a morfologiei acestora și a raportului dintre celulele viabile și cele neviabile, furnizând informații relevante privind compatibilitatea biologică a scaffold-urilor investigate.

III.5.3. Rezultate și discuții

Viabilitatea fibroblastelor NIH-3T3 cultivate timp de 24 de ore în contact direct cu scaffold-urile pe bază de gelatină, K-carragenan, CNF-uri și diferite concentrații de COOH-GO a fost evaluată prin testul Live/Dead și analizată prin microscopie de fluorescență (Figura 1). În imaginile obținute, celulele viabile sunt evidențiate prin fluorescență verde (Calcein AM), în timp ce celulele neviabile apar colorate în roșu (Ethidium homodimer-1). Analiza calitativă a imaginilor relevă o predominanță netă a celulelor viabile pentru toate compozițiile investigate, indiferent de concentrația de COOH-GO utilizată. Numărul redus de celule marcate

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 roșu indică o citotoxicitate scăzută a scaffold-urilor și demonstrează compatibilitatea acestora cu fibroblastele NIH-3T3 încă din primele 24 de ore de contact. Acest aspect sugerează că atât matricea polimerică formată din gelatină, K-carragenan și CNF, cât și adaosul de COOH-GO în intervalul de concentrații analizat (0–0.500%), nu afectează semnificativ integritatea membranei celulare.

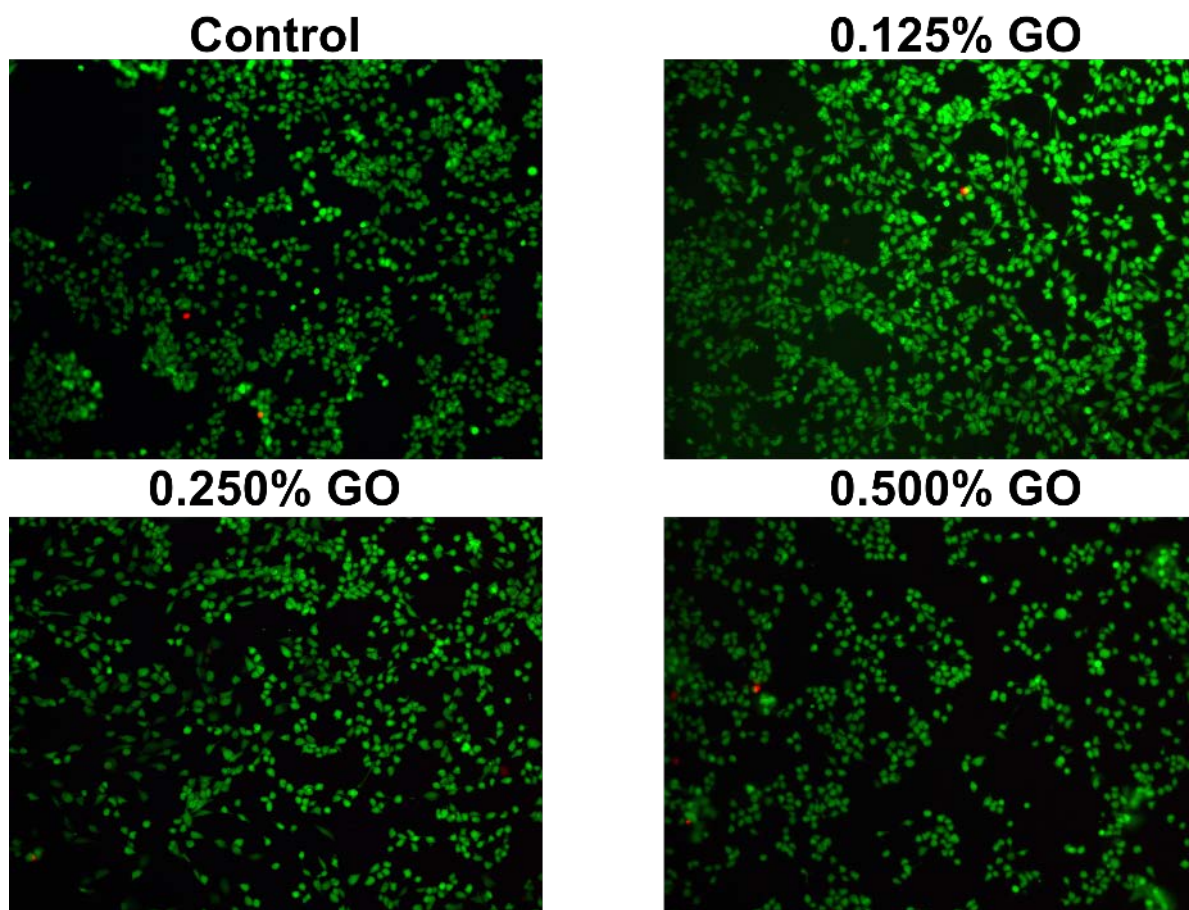


Figura 1. Imagini de microscopie de fluorescență a celulelor NIH-3T3 după 24 ore de contact cu scaffold-urile cu diferite concentrații de COOH-GO.

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

Un aspect important observat îl reprezintă morfologia celulară. Majoritatea celulelor fibroblaste prezintă o formă alungită și bine răspândită pe substrat, caracteristică celulelor aderente aflate într-o stare fiziologică normală. Prezența numeroaselor celule cu aspect fusiform indică faptul că scaffold-urile oferă condiții favorabile pentru adeziunea și organizarea citoscheletului celular. Acest comportament este esențial pentru procesele ulterioare de proliferare și sinteză a matricei extracelulare, reprezentând un indicator indirect al biocompatibilității materialelor dezvoltate. De asemenea, distribuția relativ uniformă a celulelor pe suprafața probelor sugerează existența unor caracteristici de suprafață adecvate pentru interacțiunea celulă-material. Gelatina furnizează secvențe bioactive care favorizează adeziunea celulară, în timp ce K-carragenanul și nanofibrele de celuloză contribuie la formarea unei structuri poroase și stabile, capabile să susțină atașarea și dezvoltarea celulară. Introducerea COOH-GO poate îmbunătăți proprietățile de suprafață ale scaffold-urilor, facilitând adsorbția proteinelor și interacțiunile dintre celule și biomaterial. Scaffold-urile care conțin COOH-GO nu prezintă semne evidente de toxicitate la 24 de ore de cultură. Dimpotrivă, imaginile sugerează menținerea unei densități celulare ridicate și a unei morfologii favorabile, ceea ce indică faptul că funcționalizarea GO cu grupări COOH contribuie la creșterea compatibilității biologice a materialului.

III.5.4. Concluzii

Rezultatele obținute prin testul Live/Dead evidențiază faptul că scaffold-urile pe bază de gelatină, K-carragenan, CNF-uri și COOH-GO prezintă o biocompatibilitate ridicată în raport cu celulele fibroblaste NIH-3T3 după 24 de ore de cultură *in vitro*. Analiza microscopică de fluorescență a indicat o predominanță clară a celulelor viabile, alături de o morfologie celulară alungită și o distribuție omogenă la nivelul matricei tridimensionale, aspecte ce confirmă adeziunea eficientă și interacțiunea favorabilă celulă-material. Aceste observații sugerează că arhitectura și compoziția chimică a scaffold-urilor investigate contribuie sinergic la crearea unui microambient favorabil supraviețuirii celulare, prin asigurarea atât a suportului

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

mecanic adecvat, cât și a unor proprietăți de suprafață care facilitează atașarea și migrarea celulară. În acest context, materialele evaluate demonstrează un potențial semnificativ pentru aplicații în ingineria tisulară și medicina regenerativă, unde menținerea viabilității celulare și inițierea organizării tisulare reprezintă cerințe esențiale.

Cu toate acestea, având în vedere timpul scurt de evaluare (24 de ore), rezultatele trebuie interpretate ca indicii preliminare ale biocompatibilității și performanței funcționale a materialelor. Din acest motiv, extrapolarea către comportamente pe termen lung necesită validare experimentală suplimentară. În consecință, se vor realiza teste ulterioare la intervale de timp pentru a evalua în mod riguros dinamica viabilității celulare, rata de proliferare, stabilitatea structurală a scaffold-urilor și menținerea integrității microambientului celular. Aceste investigații viitoare vor permite o caracterizare mai completă a performanței biomaterialelor și vor consolida concluziile privind aplicabilitatea lor în contexte regenerative avansate.

III.5.5. Bibliografie

- [1] M. V. Nasonova, T. V. Glushkova, V. V. Borisov, E. A. Velikanova, A. Y. Burago, and Y. A. Kudryavtseva, “Biocompatibility and Structural Features of Biodegradable Polymer Scaffolds,” *Bull. Exp. Biol. Med.*, vol. 160, no. 1, pp. 134–140, Nov. 2015, doi: 10.1007/S10517-015-3114-3/METRICS.
- [2] M. Mateu-Sanz *et al.*, “Redefining biomaterial biocompatibility: challenges for artificial intelligence and text mining,” *Trends Biotechnol.*, vol. 42, no. 4, pp. 402–417, Apr. 2024, doi: 10.1016/j.tibtech.2023.09.015.
- [3] A. M. Rahimi, M. Cai, and S. Hoyer-Fender, “Heterogeneity of the NIH3T3 Fibroblast Cell Line,” *Cells 2022, Vol. 11*, vol. 11, no. 17, Aug. 2022, doi: 10.3390/CELLS11172677.
- [4] C. Hu *et al.*, “Live-dead assay on unlabeled cells using phase imaging with computational specificity,” *Nature Communications 2022 13:1*, vol. 13, no. 1, pp. 1–8, Feb. 2022, doi: 10.1038/s41467-022-28214-x.

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] A. Azqueta, H. Stopper, B. Zegura, M. Dusinska, and P. Møller, “Do cytotoxicity and cell death cause false positive results in the in vitro comet assay?,” *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, vol. 881, p. 503520, Sep. 2022, doi: 10.1016/J.MRGENTOX.2022.503520.

III.6. Capitolul 6

III.6. Printarea 3D a structurilor de regenerare osoasă pe bază de GelMA, pectină și MXene $Ti_3C_2T_x$

III.6.1. Introducere

Scaffoldurile destinate ingineriei tisulare au fost fabricate în mod tradițional folosind tehnici precum solvent casting, liofilizarea, spumarea cu gaz și electrofilarea. Cu toate că aceste metode sunt capabile să producă structuri poroase potrivite pentru creșterea celulară, ele oferă un control limitat în ce privește geometria scaffoldului, distribuția dimensiunilor porilor, interconectivității porilor și arhitectura generală. În plus, tehnicile convenționale de fabricare conduc adesea la structuri neregulate și la o reproductibilitate slabă, ceea ce face complică imitarea cu precizie a organizării complexe a țesuturilor native. Întrucât regenerarea țesuturilor necesită un control precis al micromediului celular, aceste limitări au încurajat dezvoltarea unor abordări avansate de fabricație capabile să producă structuri mai complexe și chiar personalizabile [1], [2].

Dintre aceste abordări, imprimarea tridimensională (3D) s-a conturat ca una dintre cele mai promițătoare tehnologii în ingineria tisulară. Spre deosebire de metodele convenționale, imprimarea 3D permite fabricarea strat cu strat a scaffoldurilor direct pe baza modelelor de proiectare asistată de calculator (CAD), prezentând un control precis asupra formei, arhitecturii interne, geometriei porilor și porozității. Acest grad ridicat de control face posibilă producerea de structuri personalizabile specifice fiecărui pacient, care seamănă îndeaproape cu caracteristicile structurale ale țesuturilor naturale. În plus, imprimarea 3D asigură

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

reproductibilitatea, reduce risipa de materiale și facilitează fabricarea unor structuri complexe care ar fi dificil sau imposibil de obținut folosind tehnicile tradiționale de fabricație. Prin urmare, imprimarea 3D a devenit un instrument esențial pentru dezvoltarea scaffoldurilor biomimetice destinate regenerării tisulare și aplicațiilor din medicina regenerativă [2], [3].

Performanța unui suport imprimat 3D este semnificativ influențată de proprietățile materialelor utilizate pentru formularea inkurilor. Materialele adecvate trebuie să prezinte o imprimabilitate, biocompatibilitate, biodegradabilitate și stabilitate mecanică corespunzătoare, menținând în același timp un mediu favorabil pentru atașarea și proliferarea celulară. Polimerii naturali, precum gelatina, sau derivați ai acestora, precum gelatina metacrilată (GelMA) și pectina, au atras o atenție considerabilă datorită biocompatibilității lor excelente și asemănării cu componentele matricei extracelulare (ECM) native. Gelatina conține grupări bioactive care favorizează aderarea și proliferarea celulară, pe când GelMA combină avantajele biologice ale gelatinei cu proprietăți de reticulare fotochimică care îmbunătățesc stabilitatea mecanică. Pectina este o polizaharidă de origine naturală apreciată pentru biocompatibilitatea sa, toxicitatea redusă și capacitatea de a forma gel [4], [5], [6]. Cu toate acestea, hidrogelurile naturale prezintă, în general, o rezistență mecanică redusă, o rigiditate scăzută și o integritate structurală limitată după imprimare, ceea ce poate compromite fidelitatea și durabilitatea structurilor fabricate, mai ales în aplicațiile care implică țesuturi care suportă sarcini semnificative [5], [7].

Pentru a remedia aceste limitări, materialele de ranforsare au fost incorporate din ce în ce mai mult în inkurile pe bază de hidrogel. Printre acestea, MXenele, o familie de carburi și nitruri bidimensionale ale metalelor de tranziție, au stârnit un interes semnificativ datorită proprietăților lor fizico-chimice unice. MXenele prezintă o suprafață specifică mare, caracteristici mecanice excelente, hidrofilicitate și grupări funcționale de suprafață abundente care facilitează interacțiunile cu matricile polimerice. S-a demonstrat că incorporarea lor în sistemele de hidrogel îmbunătățește rezistența mecanică, comportamentul reologic,

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

imprimabilitatea și stabilitatea structurală, menținând în același timp proprietăți biologice favorabile. În consecință, infurile ranforsate cu MXene reprezintă o strategie promițătoare pentru îmbunătățirea performanței biomaterialelor de origine naturală utilizate în aplicațiile de inginerie tisulară [8], [9].

Pe lângă alegerea materialului, fabricarea cu succes a scaffoldurilor de înaltă calitate necesită optimizarea și controlul atent al parametrilor de imprimare. În cazul imprimării 3D bazate pe extrudare, parametri precum presiunea de extrudare, viteza de imprimare, diametrul duzei, înălțimea filamentului și temperatura de imprimare influențează în mod direct morfologia și calitatea structurii imprimate. O presiune de extrudare excesivă poate provoca răspândirea filamentului și o fidelitate redusă a formei, în timp ce o presiune insuficientă poate duce la depunerea discontinuă a filamentului. În mod similar, viteza de imprimare trebuie echilibrată cu rata de extrudare pentru a asigura formarea unor filamente continue și omogene. Diametrul duzei influențează rezoluția de imprimare și dimensiunea porilor, în timp ce înălțimea stratului determină aderența între straturi și precizia dimensională. Controlul temperaturii este deosebit de important pentru materialele termosensibile, cum ar fi inkurile pe bază de gelatină, deoarece afectează vâscozitatea, comportamentul de gelificare și imprimabilitatea [10].

Mai mult decât atât, parametrii de imprimare influențează puternic comportamentul reologic al inkului în timpul depunerii și arhitectura finală a scaffoldului. Variațiile acestor parametri pot modifica dimensiunea porilor, grosimea firelor, porozitatea și interconectivitatea, toate acestea jucând un rol esențial în difuzia nutrienților, transportul oxigenului, migrația celulară și creșterea țesutului. Selectarea necorespunzătoare a parametrilor poate duce la defecte structurale, prăbușirea straturilor imprimate, performanțe mecanice reduse și o reproductibilitate slabă. Prin urmare, optimizarea sistematică a condițiilor de imprimare este esențială pentru obținerea unor scaffolduri cu proprietăți mecanice adecvate, o fidelitate

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

ridicată a formei și o funcționalitate biologică potrivită pentru aplicațiile de inginerie tisulară [10], [11].

În acest raport este prezentată printarea 3D a formulărilor pe bază de GelMA și alginat de sodiu (Alg), respectiv GelMA, pectină și MXene $Ti_3C_2T_x$, fotoreticulate utilizând fotoinițiatorul fenil-2,4,6-trimetilbenzoilfosfinat de litiu (LAP) pentru obținerea de scaffolduri stabile, potrivite pentru regenerarea țesutului dur.

III.6.2. Materiale și sinteză

III.6.2.1. Materiale utilizate

GelMA obținută din gelatină din piele de pește, Alg, pectina din coajă de citrice și LAP au fost achiziționate de la Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, SUA), iar MXene carbură de titan $Ti_3C_2T_x$ (pulbere, 2-20 μm) a fost achiziționat de la Nanografi.

III.6.2.2. Sinteza formulărilor printabile

Acest raport prezintă protocolul de sinteză și printarea formulărilor conform protocolului optimizat, utilizând diferite concentrații de MXene. Formulările printabile au fost codificate **GP**, **GP-25MX**, **GP-50MX** și **GP-100MX** în funcție de concentrația de MXene, așa cum este descris în Tabelul 1.

Tabelul 1. Concentrații utilizate în formulările printabile

Cod	GelMA	Pectină	MXene	UV (405 nm)	LAP
GP	12%	3%	-	Da	0,25%
GP-25MX	12%	3%	0,25%	Da	0,25%
GP-50MX	12%	3%	0,50%	Da	0,25%
GP-100MX	12%	3%	1%	Da	0,25%

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 etapă, a fost preparată o soluție stoc reprezentând formularea de bază a inkului, conținând 12% (w/v) GelMA și 3% (w/v) pectină în apă ultrapură. GelMA a fost dizolvată sub agitare magnetică la temperatură controlată de 40-45 °C până la obținerea unei soluții omogene, timp de aproximativ o oră, după care ulterior s-a adăugat și pectina în mod treptat pentru a nu forma aglomerate, după care soluția a fost menținută sub agitare magnetică la 40-45 °C pentru aproximativ 4 ore. După omogenizarea completă, a fost adăugat fotoinițiatorul LAP, menținând formularea sub agitare continuă. Deoarece LAP este fotosensibil, toate etapele ulterioare adăugării sale au fost realizate în condiții de iluminare redusă pentru a preveni inițierea prematură a fotopolimerizării.

În paralel, a fost preparată o dispersie stoc de MXene $\text{Ti}_3\text{C}_2\text{T}_x$ de 100 mL cu concentrația de 75 mg/mL, prin dispersarea materialului în apă ultrapură. Dispersia a fost ultrasonată utilizând o sondă la o amplitudine de 30%, cu un puls de 15s și o pauză de 5s, timp de 30 de minute, pentru a asigura exfolierea și dispersia uniformă a nanomaterialului.

Formulările experimentale au fost obținute prin amestecarea soluției stoc de GelMA și pectină cu dispersia stoc de MXene în rapoarte volumetrice corespunzătoare, astfel încât concentrația finală de MXene să fie de 0,25%, 0,50% și, respectiv, 1% (w/v), menținând aproximativ constantă concentrația componentelor polimerice. Amestecarea s-a realizat sub agitare magnetică până la obținerea unor inkuri omogene, fără agregate vizibile, după care au fost păstrate la frigider peste noapte în vederea gelificării fizice a gelatinei cu scopul creșterii vâscozității.

Inkurile obținute au fost încărcate în cartușele bioimprimantei BioX6 de la CELLINK și extrudate utilizând un ac cilindric cu diametrul intern de 23G (0,33 mm). Parametrii de printare au fost optimizați pentru fiecare formulare și sunt prezentați în secțiunea următoare.

După depunerea fiecărui strat, structurile imprimate au fost fotoreticulate utilizând radiația corespunzătoare fotoinițiatorului LAP, respectiv UV cu lungimea de undă de 405 nm, fiecare strat fiind expus timp de 20 de secunde.

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

III.6.3. Printarea 3D și evaluarea printabilității

Tabelele 2-5 prezintă rezultatele printării 3D. Acestea redau relația dintre fidelitatea de printare a probelor și parametrii procesului, evidențiind toate variațiile privind dimensiunile, presiunea, viteza și observațiile privind calitatea printării.

Tabelul 2 prezintă o analiză detaliată a performanței formulării GP (control), utilizată ca probă de referință în procesul de printare. Pentru a investiga impactul presiunii asupra uniformității filamentului și apariției defectelor, aceasta a fost variată sistematic, menținând constantă viteza de printare. Rezultatele experimentale subliniază influența semnificativă a acestui parametru asupra calității filamentului extrudat.

Tabelul 2. Parametrii și rezultatele procesului de printare pentru probele GP

GP (control)			
Nr. Crt	Parametrii de printare	Imagini printare	Observații printare
1	Dimensiunile selectate: 10x10x0,3 mm Diametrul acului de printare: 23G Procentul de umplere: 25% Temperatura cartușului: 25°C Presiune: 45 kPa Viteza de printare: 10 mm/s		<i>S-a observat că presiunea de 45 kPa nu produce probe de fidelitate crescută, și filament discontinuu.</i>

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

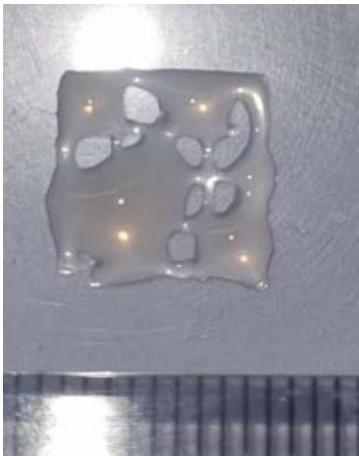
Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

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

	Lungime de undă: 405 nm Timp de expunere radiație: 10s/strat Distanță sursă – platformă: 4 cm		
2	Dimensiunile selectate: 10x10x0,3 mm Diametrul acului de printare: 23G Procentul de umplere: 25% Temperatura cartușului: 25°C Presiune: 50 kPa Viteza de printare: 10 mm/s Lungime de undă: 405 nm Timp de expunere radiație: 10s/strat Distanță sursă – platformă: 4 cm		<i>Creșterea presiunii la 50 kPa nu a fost suficientă pentru obținerea unor structuri de fidelitate crescută. Filamentul a început să fie continuu, însă viscozitatea soluției este foarte ridicată. Astfel, mai departe s-a decis scăderea temperaturii pe cartușul de printare, dar și pe patul de printare, și creșterea timpului de expunere la radiația UV în vederea obținerii unor structuri mai stabile mecanic.</i>

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

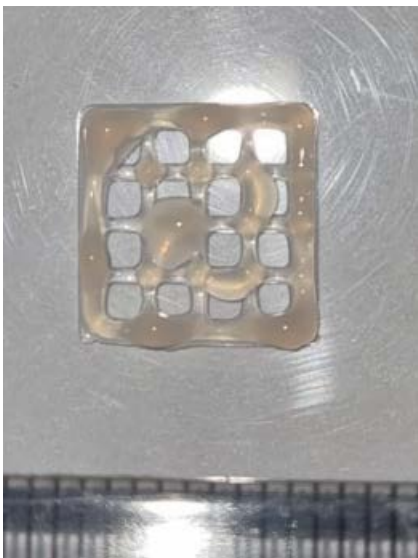
Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

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

3	Dimensiunile selectate: 10x10x0,3 mm Diametru acului de printare: 23G Procentul de umplere: 25% Temperatura cartușului: 15°C Temperatura patului de printare: 15°C Presiune: 55 kPa Viteza de printare: 10 mm/s Lungime de undă: 405 nm Timp de expunere radiație: 20s/strat Distanță sursă – platformă: 4 cm		<i>Scăderea temperaturii atât pe cartuș cât și pe patul de printare, dar și prelungirea timpului de expunere la radiație, au avut un efect benefic asupra vâscozității filamentului și în consecință a structurii scaffoldului. Cu toate acestea, vâscozitatea tot este puțin crescută și structura obținută nu este complet fidelă modelului digital.</i>
---	---	---	---

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

4	Dimensiunile selectate: 10x10x0,3 mm Diametru acului de printare: 23G Procentul de umplere: 25% Temperatura cartușului: 10°C Temperatura patului de printare: 10°C Presiune: 60 kPa Viteza de printare: 10 mm/s Lungime de undă: 405 nm Timp de expunere radiație: 20s/strat Distanță sursă – platformă: 4 cm		<i>Scăderea cu încă câteva °C a patului de printare și a cartușului au condus la un filament mai puțin vâscos și la o structură mai stabilă.</i>
---	---	---	---

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	Dimensiunile selectate: 10x10x0,3 mm Diametru acului de printare: 23G Procentul de umplere: 25% Temperatura cartușului: 10°C Temperatura patului de printare: 10°C Presiune: 70 kPa Viteza de printare: 10 mm/s Lungime de undă: 405 nm Timp de expunere radiație: 20s/strat Distanță sursă – platformă: 4 cm		<i>Creșterea presiunii peste 65 kPa a dus și mai mult la închiderea porilor și scăderea mai drastică a fidelității imprimării</i>
---	---	--	--

Tabelul 3 prezintă o perspectivă asupra performanței formulării GP-25MX în procesul de printare, evidențiind impactul variabilității presiunii asupra calității filamentului extrudat și fidelității structurilor rezultate.

Tabelul 3. Parametrii și rezultatele procesului de printare pentru probele GP-25MX

GP-25MX

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

Nr. Crt	Parametrii de printare	Imagini printare	Observații printare
1	Dimensiunile selectate: 10x10x0,3 mm Diametrul acului de printare: 23G Procentul de umplere: 25% Temperatura cartușului: 20°C Presiune: 40 kPa Viteza de printare: 10 mm/s Lungime de undă: 405 nm Timp de expunere radiație: 20s/strat Distanță sursă – platformă: 4 cm		<i>S-a observat că presiunea de 40 kPa nu produce probe de fidelitate crescută, și filament discontinuu.</i>

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

2	Dimensiunile selectate: 10x10x0,3 mm Diametrul acului de printare: 23G Procentul de umplere: 25% Temperatura cartușului: 15°C Presiune: 60 kPa Viteza de printare: 10 mm/s Lungime de undă: 405 nm Timp de expunere radiație: 20s/strat Distanță sursă – platformă: 4 cm		<i>Creșterea presiunii nu a fost suficientă pentru obținerea unor structuri de fidelitate crescută. Filamentul a început să fie continuu, însă vâscozitatea soluției este foarte ridicată. Astfel, mai departe s-a decis scăderea temperaturii pe cartușul de printare, dar și pe patul de printare, în vederea obținerii unor structuri mai stabile mecanic.</i>
---	--	---	--

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

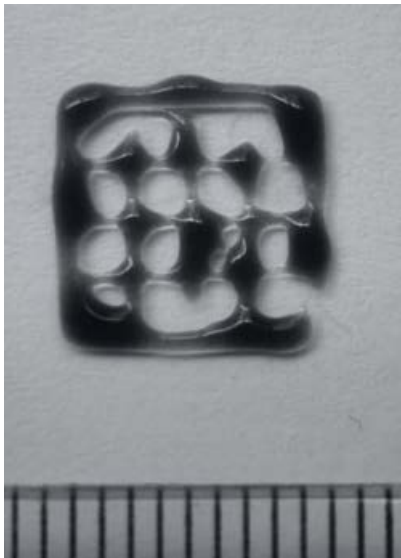
Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

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

3	Dimensiunile selectate: 10x10x0,3 mm Diametru acului de printare: 23G Procentul de umplere: 25% Temperatura cartușului: 10°C Temperatura patului de printare: 10°C Presiune: 60 kPa Viteza de printare: 10 mm/s Lungime de undă: 405 nm Timp de expunere radiație: 20s/strat Distanță sursă – platformă: 4 cm		<i>Scăderea temperaturii atât pe cartuș cât și pe patul de printare, au avut un efect benefic asupra fidelității filamentului. Cu toate acestea, vâscozitatea tot este puțin crescută și structura obținută nu este complet fidelă modelului digital.</i>
---	---	---	--

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

4	Dimensiunile selectate: 10x10x0,3 mm Diametru acului de printare: 23G Procentul de umplere: 25% Temperatura cartușului: 10°C Temperatura patului de printare: 10°C Presiune: 65 kPa Viteza de printare: 10 mm/s Lungime de undă: 405 nm Timp de expunere radiație: 20s/strat Distanță sursă – platformă: 4 cm		<i>Filamentul este discontinuu și, în consecință, fidelitatea printării este scăzută, iar stabilitatea structurii redusă.</i>
---	---	---	--

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

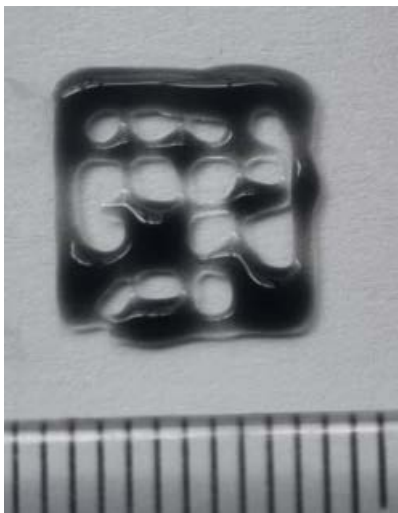
Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

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	Dimensiunile selectate: 10x10x0,3 mm Diametru acului de printare: 23G Procentul de umplere: 25% Temperatura cartușului: 10°C Temperatura patului de printare: 10°C Presiune: 70 kPa Viteza de printare: 10 mm/s Lungime de undă: 405 nm Timp de expunere radiație: 20s/strat Distanță sursă – platformă: 4 cm		<i>Filamentul începe să fie continuu, însă porii pare că încep să își reducă dimensiunea.</i>
---	---	---	--

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

6	Dimensiunile selectate: 10x10x0,3 mm Diametru acului de printare: 23G Procentul de umplere: 25% Temperatura cartușului: 10°C Temperatura patului de printare: 10°C Presiune: 75 kPa Viteza de printare: 10 mm/s Lungime de undă: 405 nm Timp de expunere radiație: 20s/strat Distanță sursă – platformă: 4 cm		<i>Filamentul este continuu, însă porii își reduc și mai dimensiunea, conducând la o fidelitate a printării mai scăzută..</i>
---	---	---	--

Tabelul 4 prezintă o perspectivă asupra performanței formulării GP-50MX în procesul de printare, evidențiind impactul variabilității presiunii asupra calității filamentului extrudat și fidelității structurilor rezultate.

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

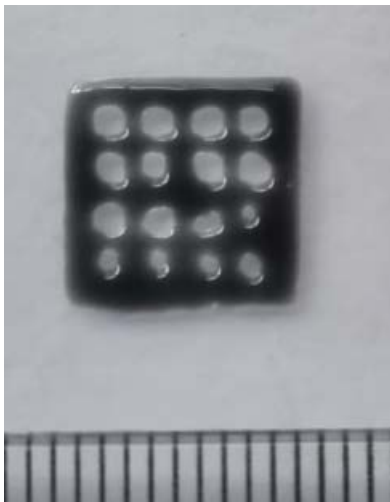
Codul proiectului: 213

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 4. Parametrii și rezultatele procesului de printare pentru probele GP-25MX

GP-50MX			
Nr. Crt	Parametrii de printare	Imagini printare	Observații printare
1	Dimensiunile selectate: 10x10x0,3 mm Diametrul acului de printare: 23G Procentul de umplere: 25% Temperatura cartușului: 10°C Temperatura patului de printare: 10°C Presiune: 60 kPa Viteza de printare: 10 mm/s Lungime de undă: 405 nm Timp de expunere radiație: 20s/strat Distanță sursă – platformă: 4 cm		<i>S-a observat că presiunea de 60 kPa cu temperatura cartușului dar și a patului de printare deja scăzute produce un filament continuu și o fidelitate a printării destul de ridicată</i>

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

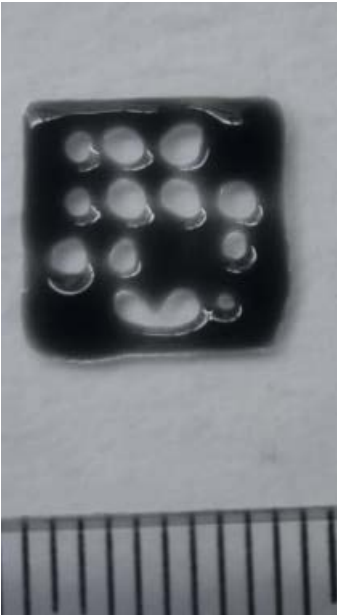
Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

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

2	Dimensiunile selectate: 10x10x0,3 mm Diametrul acului de printare: 23G Procentul de umplere: 25% Temperatura cartușului: 10°C Temperatura patului de printare: 10°C Presiune: 65 kPa Viteza de printare: 10 mm/s Lungime de undă: 405 nm Timp de expunere radiație: 20s/strat Distanță sursă – platformă: 4 cm		<i>Creșterea presiunii nu a condus la obținerea unor structuri de fidelitate crescută. Porii au început să se închidă.</i>
---	--	---	---

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

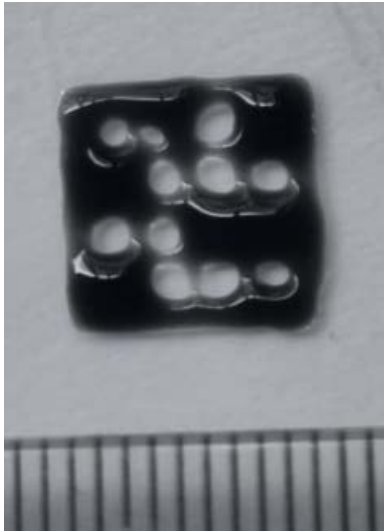
Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

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

3	Dimensiunile selectate: 10x10x0,3 mm Diametru acului de printare: 23G Procentul de umplere: 25% Temperatura cartușului: 10°C Temperatura patului de printare: 10°C Presiune: 70 kPa Viteza de printare: 10 mm/s Lungime de undă: 405 nm Timp de expunere radiație: 20s/strat Distanță sursă – platformă: 4 cm		<i>Creșterea presiunii a dus la închiderea și mai pronunțată a porilor, scăzând astfel fidelitatea printării.</i>
---	---	---	--

Tabelul 5 prezintă o perspectivă asupra performanței formulării GP-50MX în procesul de printare, evidențiind impactul variabilității presiunii asupra calității filamentului extrudat și fidelității structurilor rezultate.

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

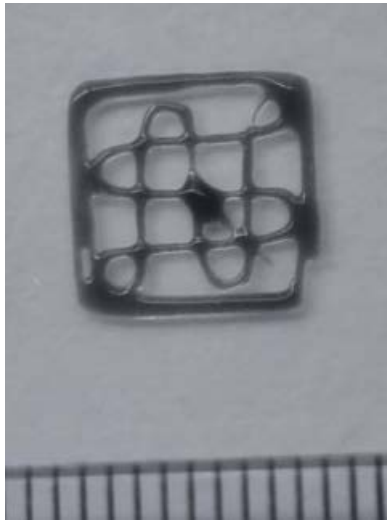
Codul proiectului: 213

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 5. Parametrii și rezultatele procesului de printare pentru probele GP-100MX

GP-100MX			
Nr. Crt	Parametrii de printare	Imagini printare	Observații printare
1	Dimensiunile selectate: 10x10x0,3 mm Diametrul acului de printare: 23G Procentul de umplere: 25% Temperatura cartușului: 10°C Temperatura patului de printare: 10°C Presiune: 60 kPa Viteza de printare: 10 mm/s Lungime de undă: 405 nm Timp de expunere radiație: 20s/strat Distanță sursă – platformă: 4 cm		<i>S-a observat că presiunea de 60 kPa duce la formarea unui filament prea subțire</i>

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

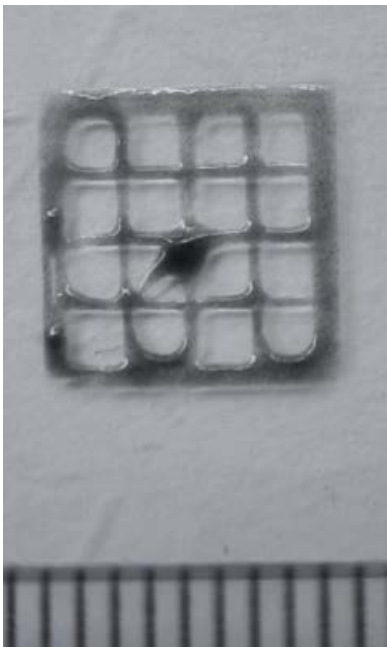
Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

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

2	Dimensiunile selectate: 10x10x0,3 mm Diametrul acului de printare: 23G Procentul de umplere: 25% Temperatura cartușului: 10°C Temperatura patului de printare: 10°C Presiune: 65 kPa Viteza de printare: 10 mm/s Lungime de undă: 405 nm Timp de expunere radiație: 20s/strat Distanță sursă – platformă: 4 cm		<i>S-a observat că presiunea de 65 kPa cu temperatura cartușului dar și a patului de printare deja scăzute produce un filament continuu și o fidelitate a printării destul de ridicată. Cu toate acestea, filamentul pare să fie destul de subțire</i>
---	--	---	---

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

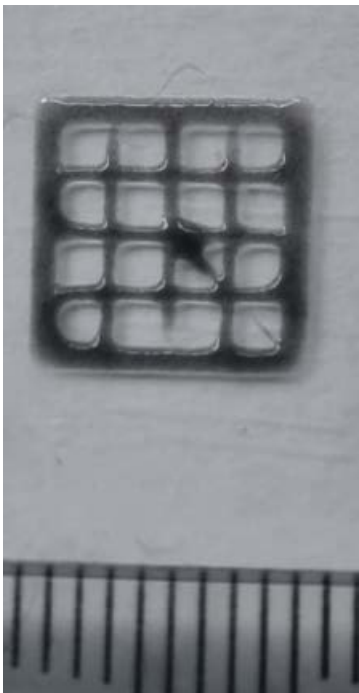
Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

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

3	Dimensiunile selectate: 10x10x0,3 mm Diametrul acului de printare: 23G Procentul de umplere: 25% Temperatura cartușului: 10°C Temperatura patului de printare: 10°C Presiune: 70 kPa Viteza de printare: 10 mm/s Lungime de undă: 405 nm Timp de expunere radiație: 20s/strat Distanță sursă – platformă: 4 cm		<i>Creșterea presiunii a condus la obținerea unor structuri cu fidelitate mai crescută decât încercarea anterioară.</i>
---	--	---	--

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

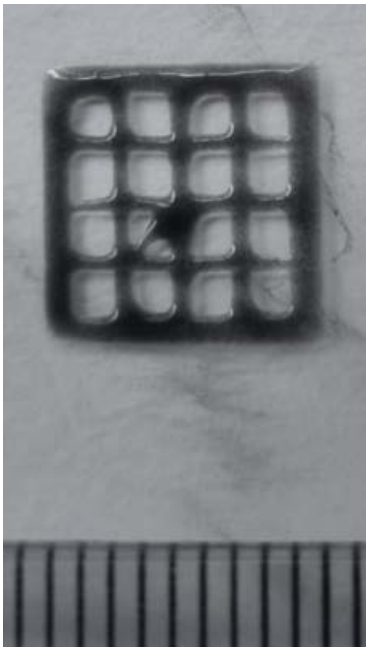
Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

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

4	Dimensiunile selectate: 10x10x0,3 mm Diametru acului de printare: 23G Procentul de umplere: 25% Temperatura cartușului: 10°C Temperatura patului de printare: 10°C Presiune: 75 kPa Viteza de printare: 10 mm/s Lungime de undă: 405 nm Timp de expunere radiație: 20s/strat Distanță sursă – platformă: 4 cm		<i>Creșterea presiunii a condus la obținerea unor structuri cu fidelitate puțin chiar mai crescută decât încercarea anterioară. Filamentul este continuu și suficient de gros, porii sunt deschiși și pătrățoși, similari modelului digital.</i>
---	---	---	---

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

4	Dimensiunile selectate: 10x10x0,3 mm Diametru acului de printare: 23G Procentul de umplere: 25% Temperatura cartușului: 10°C Temperatura patului de printare: 10°C Presiune: 80 kPa Viteza de printare: 10 mm/s Lungime de undă: 405 nm Timp de expunere radiație: 20s/strat Distanță sursă – platformă: 4 cm		<i>Creșterea presiunii a condus la obținerea unor structuri cu fidelitate mai scăzută decât încercarea anterioară. Filamentul este continuu însă porii încep să se rotunjească și micșoreze, contrat modelului digital.</i>
---	---	---	--

III.6.4. Concluzii

Rezultatele experimentale prezentate în acest raport evidențiază impactul critic al parametrilor de proces (presiune, temperatură și timp de expunere) și al compoziției chimice asupra printabilității și fidelității geometrice a scaffoldurilor pe bază de GelMA, pectină și MXene. Studiul sistematic a demonstrat că optimizarea reologică prin modificarea temperaturii cartușului și a patului de printare reprezintă o etapă esențială pentru controlul

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

comportamentului de curgere al inkurilor. Variațiile de presiune aplicate au influențat direct continuitatea filamentului extrudat și menținerea porozității deschise, demonstrând că fiecare formulare polimerică necesită o fereastră specifică de procesare pentru a mimetiza cu precizie modelul digital proiectat.

În cazul formulării de bază GP (control), testele inițiale efectuate la 25 °C și presiuni de 45–50 kPa au condus la structuri cu fidelitate scăzută din cauza vâscozității neadecvate, fiind necesară o ajustare termică drastică. Prin scăderea temperaturii cartușului și a patului la 10 °C, corelată cu extinderea timpului de expunere la radiația UV 405 nm la 20 s/strat, s-a obținut o stabilizare structurală superioară și un filament optim la o presiune de 60 kPa. Cu toate acestea, depășirea pragului de 65 kPa a provocat fenomenul de închidere timpurie a porilor, confirmând sensibilitatea crescută a hidroamestecului pur la variațiile de forfecare.

Introducerea nanomaterialului bidimensional MXene a modificat în mod distinct proprietățile reologice ale sistemului în funcție de concentrația utilizată. Pentru formularea GP-25MX, scăderea temperaturii la 10 °C a îmbunătățit rezoluția, însă comportamentul de curgere a rămas instabil în domeniul 60–70 kPa, manifestând tendințe de discontinuitate sau de reducere a porilor la presiuni mari. În mod similar, proba GP-50MX a prezentat un filament continuu și o fidelitate ridicată exclusiv la presiunea moderată de 60 kPa, orice incrementare ulterioară a presiunii (65–70 kPa) conducând la obstrucționarea geometriei interne a porilor.

Performanța optimă globală a fost identificată în cazul formulării GP-100MX, unde adăugarea unei cantități mai mari de nanomaterial a oferit un suport structural superior în timpul extrudării. La temperatura controlată de 10 °C și o presiune de 75 kPa, s-a reușit obținerea unor filamente continue și suficient de groase, generând pori deschiși și bine definiți geometric (pătrățoși), într-o deplină concordanță cu modelul CAD de referință. În concluzie, ranforsarea cu MXene acționează ca un excelent agent de stabilizare mecanică și reologică, dar succesul biofabricării scaffoldurilor pentru regenerare osoasă rămâne strict condiționat de calibrarea riguroasă a presiunii și a managementului termic din timpul printării.

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

III.6.5. Bibliography

- [1] Hutmacher, D.W. (2000). **Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage**. Biomaterials, 21(24), 2529–2543. DOI: 10.1016/S0142-9612(00)00121-6
- [2] Murphy, S.V., & Atala, A. (2014). **3D bioprinting of tissues and organs**. Nature Biotechnology, 32(8), 773–785. DOI: 10.1038/nbt.2958
- [3] Mandrycky, C., Wang, Z., Kim, K., & Kim, D.H. (2016). **3D bioprinting for engineering complex tissues**. Biotechnology Advances, 34(4), 422–434. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2015.12.011
- [4] Van Den Bulcke, A.I., et al. (2000). **Structural and rheological properties of methacrylamide modified gelatin hydrogels**. Biomacromolecules, 1(1), 31–38. DOI: 10.1021/bm990017d
- [5] Yue, K., et al. (2015). **Synthesis, properties, and biomedical applications of GelMA hydrogels**. Biomaterials, 73, 254–271. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2015.08.045
- [6] Munarin, F., et al. (2012). **Pectin-based injectable biomaterials for bone tissue engineering**. Biomacromolecules, 13(4), 1084–1092. DOI: 10.1021/bm201751j
- [7] Loessner, D., et al. (2016). **Gelatin-methacryloyl hydrogels: Towards biofabrication-based tissue repair**. Trends in Biotechnology, 34(5), 394–407. DOI: 10.1016/j.tibtech.2016.01.002
- [8] Zha, X., et al. (2020). **MXene-based nanocomposite hydrogels for biomedical applications**. Bioactive Materials, 5(4), 1131–1145. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2020.08.029
- [9] Rasool, K., et al. (2016). **Antibacterial activity of Ti3C2Tx MXene**. ACS Nano, 10(3), 3674–3684. DOI: 10.1021/acsnano.6b00181
- [10] Ying, G., Jiang, N., Yu, C., & Zhang, Y.S. (2018). **Three-dimensional bioprinting of gelatin methacryloyl (GelMA)**. Micromachines, 9(4), 185. DOI: 10.3390/mi9040185
- [11] Groll, J., et al. (2018). **A definition of bioinks and their distinction from biomaterial inks**. Biofabrication, 11(1), 013001. DOI: 10.1088/1758-5090/aaec52

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

Activitățile desfășurate în perioada aprilie-iunie 2026 au contribuit semnificativ la avansarea obiectivelor propuse în cadrul proiectului REOSTEOMi, prin consolidarea direcțiilor experimentale privind dezvoltarea, caracterizarea și validarea preliminară a unor sisteme biomateriale destinate regenerării osoase și aplicațiilor asociate complicațiilor produse de mielomul multiplu. În această etapă, cercetarea a urmărit integrarea mai multor niveluri de analiză, incluzând formularea și printarea 3D a scaffoldurilor, evaluarea răspunsului celular, caracterizarea morfologică și chimică, analiza mecanică, precum și dezvoltarea unor sisteme preliminare pentru complexarea și livrarea acizilor nucleici. Prin această abordare, rezultatele obținute au oferit o imagine mai completă asupra relației dintre compoziția materialelor, comportamentul lor structural și răspunsul biologic indus.

Un rezultat important al acestei etape a fost continuarea studiilor privind scaffoldurile printabile pe bază de alginat, κ -caragenan și spirulină. Analizele morfologice prin SEM au arătat că variația raportului dintre alginat și κ -caragenan, precum și introducerea spirulinei, influențează direct arhitectura filamentelor, uniformitatea structurii și calitatea suprafeței scaffoldurilor. Probele fără spirulină au prezentat, în general, filamente mai neuniforme și defecte structurale mai evidente, în timp ce formulările care conțin spirulină au indicat o îmbunătățire a fidelității de printare și a stabilității morfologice. Aceste rezultate sugerează că spirulina poate contribui la optimizarea comportamentului materialului în timpul extrudării și la obținerea unor structuri mai bine definite pentru aplicații de inginerie tisulară osoasă.

Din punct de vedere biologic, testele MTT și LDH efectuate pe probele printate 3D pe bază de alginat, κ -caragenan și spirulină au permis evaluarea activității metabolice și a citotoxicității în contact direct cu celule MC3T3-E1. Rezultatele au arătat că includerea spirulinei a avut un efect favorabil asupra răspunsului celular, în special în cazul formulărilor cu raport alginat/ κ -caragenan 2:1. Dintre probele analizate, formularea 21-0.5 s-a evidențiat prin cel mai bun echilibru între menținerea activității metabolice și absența unui efect citotoxic

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

major. Această probă a susținut viabilitatea celulară la niveluri apropiate sau superioare controlului negativ și a prezentat valori LDH doar moderat crescute, fără indicii de afectare severă a membranei celulare. Prin urmare, formularea 21-0.5 poate fi considerată cea mai promițătoare compoziție din această serie pentru etapele ulterioare de optimizare și validare.

În paralel, au fost continuate studiile privind sistemele pe bază de GelMA, GellanMA și oxid de grafenă, cu scopul de a obține hidrogeluri fotoreticulabile și scaffolduri printate 3D cu proprietăți adaptate aplicațiilor de biofabricare. Integrarea oxidului de grafenă a permis investigarea efectului componentelor nanostructurate asupra printabilității, stabilității și răspunsului celular. Evaluările biologice prin Live/Dead și microscopie confocală au oferit informații privind distribuția și supraviețuirea celulelor în contact cu structurile dezvoltate. Aceste rezultate au contribuit la clarificarea modului în care compoziția hidrogelurilor și prezența derivaților grafenici pot influența comportamentul celular și pot ghida selecția formulărilor cu potențial pentru aplicații în regenerarea osoasă.

Caracterizarea probelor post-implantare pe bază de gelatină, κ -caragenan, nanofibre de celuloză și COOH-GO a reprezentat o componentă esențială a acestei etape. Analizele SEM ale probelor explantate au oferit informații privind modificările morfologice apărute după contactul cu mediul biologic, inclusiv posibile procese de remodelare, depunere de material biologic și integrare tisulară. În același timp, analizele FTIR au confirmat menținerea semnăturii chimice a matricei organice și au evidențiat modificări asociate interacțiunii dintre scaffold, GO-COOH, BMP și mediul in vivo. Cele mai clare indicii de mineralizare au fost observate pentru probele care conțin BMP, în special seria V4-V6, ceea ce susține rolul factorului osteogenic în stimularea depunerilor minerale după implantare.

Evaluarea mecanică preliminară a scaffoldurilor pe bază de gelatină, κ -caragenan, nanofibre de celuloză și COOH-GO a adus informații importante privind comportamentul acestor materiale la compresiune. Rezultatele au arătat că modificarea concentrației de COOH-GO influențează răspunsul mecanic al scaffoldurilor, inclusiv rigiditatea și comportamentul la

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

deformare. Creșterea conținutului de COOH-GO a fost asociată cu modificări ale rezistenței structurale, ceea ce indică rolul componentelor grafenice în consolidarea rețelei polimerice. Aceste date sunt importante pentru selecția formulărilor destinate aplicațiilor osoase, deoarece substituenții dezvoltați trebuie să îmbine stabilitatea mecanică, porozitatea adecvată și compatibilitatea biologică.

O altă direcție relevantă a fost dezvoltarea unor sisteme preliminare pentru complexarea și livrarea acizilor nucleici. Poliplexii PEI/ADN și PBAE/ADN au fost obținuți și caracterizați dimensional prin DLS, evidențiind faptul că raportul dintre ADN și polimer influențează direct dimensiunea, uniformitatea și stabilitatea complexelor formate. Pentru sistemul PEI/ADN, raportul N/P 15 a oferit un profil favorabil, prin dimensiuni nanometrice și polidispersitate redusă. Pentru sistemul PBAE/ADN, rapoartele intermediare au permis obținerea unor complexe relativ uniforme și stabile pe termen scurt. Aceste rezultate susțin potențialul polimerilor cationici pentru complexarea ADN-ului monocatenar și oferă o bază experimentală pentru dezvoltarea ulterioară a unor strategii de livrare a acizilor nucleici în cadrul proiectului. Pe lângă activitățile experimentale, perioada raportată a inclus și o componentă importantă de valorificare, redactare și diseminare științifică. Au fost realizate modificări și completări pentru articole științifice aflate în diferite etape de pregătire, revizuire sau înaintare spre publicare, incluzând lucrări privind scaffoldurile GelMA/GellanMA cu oxid de grafenă, modelele in vitro ale microambientului tumoral osos, biomaterialele pe bază de MXene, biosenzorii fluorescenți și materialele funcționale proiectate prin strategii asistate de inteligență artificială. De asemenea, a fost continuată pregătirea documentației pentru brevetul european privind formulări imprimabile și/sau bioimprimabile 3D pe bază de alginat, κ -caragenan și spirulină, prin integrarea rezultatelor obținute din studiile de formulare, printare 3D și evaluare biologică preliminară. În ansamblu, rezultatele obținute în perioada aprilie-iunie 2026 arată că activitatea de cercetare s-a desfășurat într-o manieră integrată, prin corelarea dezvoltării materialelor cu evaluarea lor morfologică, mecanică, chimică și biologică. Au fost identificați parametri de

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

compoziție favorabili pentru scaffoldurile pe bază de alginat, κ -caragenan și spirulină, au fost obținute date relevante privind comportamentul probelor post-implantare pe bază de gelatină, κ -caragenan, CNF și COOH-GO, iar sistemele PEI/ADN și PBAE/ADN au oferit rezultate preliminare utile pentru direcția de livrare a acizilor nucleici. Toate aceste rezultate susțin avansarea proiectului REOSTEOMi către etapele următoare de optimizare, validare funcțională și evaluare in vivo a substituenților osoși dezvoltați.

Tot în această etapă au fost realizate și încercări preliminare de printare 3D utilizând formulări pe bază de gelatină metacrilată, pectină și MXene, cu scopul de a evalua influența materialului nanostructurat asupra comportamentului la extrudare și asupra stabilității filamentelor depuse. MXene a fost introdus în formulări în concentrații diferite, respectiv 0,1%, 0,2% și 0,3%, pentru a identifica intervalul compozițional cu cel mai bun răspuns din punct de vedere al printabilității. Rezultatele preliminare au arătat că formularea cu 0,3% MXene a prezentat cel mai bun comportament la printare, prin formarea unor filamente mai stabile și mai bine definite. Aceste observații indică faptul că integrarea MXene poate contribui la îmbunătățirea proprietăților de procesare ale hidrogelurilor și susține continuarea optimizării acestor sisteme pentru aplicații de biofabricare și inginerie tisulară.

Testul Live/Dead a demonstrat că scaffold-urile analizate au o biocompatibilitate ridicată și oferă un microambient favorabil atașării și supraviețuirii celulelor fibroblaste după 24 de ore, indicând un potențial major în ingineria tisulară. Totuși, fiind vorba de rezultate preliminare pe termen scurt, sunt necesare teste ulterioare pentru a evalua riguros proliferarea celulară și stabilitatea structurală pe termen lung a biomaterialelor.

Prin datele generate în această etapă, proiectul a progresat în direcția dezvoltării unor soluții personalizate pentru regenerarea osoasă, bazate pe biomateriale naturale, componente bioactive, derivați grafenici și tehnologii de fabricație aditivă. Rezultatele obținute oferă o bază solidă pentru selecția formulărilor cu potențial ridicat, pentru rafinarea parametrilor de printare și bioprintare 3D și pentru continuarea investigațiilor biologice și funcționale. În același timp,

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

activitățile de diseminare, brevetare și redactare științifică au contribuit la valorificarea rezultatelor și la consolidarea direcțiilor de cercetare dezvoltate în cadrul REOSTEOMi.