

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

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 iulie-septembrie 2025

Continuând direcțiile de cercetare stabilite în etapele anterioare ale proiectului, care au vizat dezvoltarea și caracterizarea unor biomateriale inovatoare cu potențial aplicativ în regenerarea osoasă, etapa actuală se concentrează pe aprofundarea acestor rezultate prin integrarea tehnologiilor de printare 3D și analiza scaffoldurilor obținute.

Proiectul REOSTEOMI are ca scop dezvoltarea unor soluții terapeutice de ultimă generație destinate gestionării complicațiilor asociate mielomului multiplu (MM), o afecțiune complexă a măduvei osoase care afectează profund calitatea vieții pacienților. Prin valorificarea progreselor recente în domeniul biomaterialelor și al ingineriei tisulare, proiectul urmărește să creeze platforme funcționale capabile să ofere alternative eficiente și personalizate pentru regenerarea și repararea țesutului osos compromis. Un element central al acestei inițiative îl constituie tehnologia de printare tridimensională (3D), care permite conceperea și fabricarea unor structuri cu grad ridicat de complexitate și adaptabilitate. Aceste structuri sunt proiectate astfel încât să reproducă fidel arhitectura naturală a osului și să ofere un suport mecanic și biologic favorabil proceselor regenerative. Prin caracteristicile lor morfologice și funcționale, scaffoldurile 3D pot stimula atașarea și proliferarea celulară, precum și diferențierea osteogenică, ceea ce le transformă în instrumente esențiale pentru terapiile avansate de reconstrucție tisulară.

În cadrul Etapei 9 a proiectului, desfășurată în perioada iulie–septembrie 2025, eforturile de cercetare s-au orientat asupra analizei scaffoldurilor pe bază de gelatină metacrilată (GelMA), gellan metacrilat (GellanMA) și oxid de grafenă (GO) în diferite concentrații, vizând în special investigarea proprietăților nanomecanice și a comportamentului reologic al acestora. În paralel, au fost dezvoltate și scaffolduri hibride obținute din gelatină, κ-carragenan, nanofibre de celuloză (CNF) și oxid de grafenă carboxilat, structuri care au fost ulterior înghețate, liofilizate și caracterizate pentru a le evalua printabilitatea și stabilitatea.

Totodată, o componentă complementară a etapei a vizat elaborarea articolului “Nanostructured Gelatin-Gellan Inks Double Reinforced with Cellulose Nanofibrils and Graphene Derivatives for 3D Printing in Bone Regeneration Applications”. În cadrul acestuia au fost prezentate studii experimentale asupra scaffoldurilor fabricate din gelatină, gellan, CNF și derivați grafenici, evaluându-se viabilitatea celulară prin teste Live/Dead efectuate la intervale de 1, 4, 7 și 14 zile. Aceste rezultate oferă o perspectivă solidă asupra potențialului biomaterialelor nanostructurate în aplicațiile de regenerare osoasă, completând în mod sinergic obiectivele și direcțiile de cercetare ale proiectului REOSTEOMI.

Prin urmare, activitățile de cercetare desfășurate în această etapă sunt integrate strategic în următoarele etape ale planului de realizare a proiectului:

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

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

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

În cadrul acestei subactivități s-au realizat:

- Sinteza unor formulări printabile din gelatină, K-carragenan și CNF-uri.
- Obținerea de scaffolduri prin printare 3D a celor două formulări menționate anterior și reticularea acestora utilizând clorură de calciu și genipin.
- Experimente de înghețare a scaffoldurilor.

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

În cadrul acestei subactivități s-a realizat:

- Evaluarea proprietăților nanomecanice ale structurilor din GelMA, gellan metacrilat și diferite concentrații de oxid de grafenă
- Sinteza unor formulări printabile din gelatină, K-carragenan, CNF-uri și GO-Carboxilat.

Subactivitatea 1.4. Printarea 3D cu formulări printabile 4D și formulări printabile 4D cu celule.

În cadrul acestei subactivități s-au realizat:

- Prelucrarea datelor privind printarea 3D a formulării conținând gelatină, K-carragenan, CNF-uri și GO din punct de vedere al printabilității.
- Evaluarea proprietăților nanomecanice ale structurilor din GelMA, gellan metacrilat și diferite concentrații de oxid de grafenă.
- Efectuarea de experimente de dezghețare, menținere și înghețare a liniei celulare MG63, pentru utilizarea în experimente de viabilitate celulară.

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

În cadrul acestei subactivități s-au analizat:

- Analiza biocompatibilității scaffoldurilor din gelatină, gella, CNF-uri și diferiți derivați grafenici, prin teste Live/Dead.
- Elaborare articolului anexat „3D Printing of Multicomponent Polymeric Inks Enables Hierarchical Hybrid Architectures for Bone Tissue Regeneration” înaintat spre publicare în jurnal Materials Advances Today cu FI 8.0
- Revizuirea articolelor anexate cu titlul “Nanostructured Gelatin-Gellan Inks Double Reinforced with Cellulose Nanofibrils and Graphene Derivatives for 3D Printing in Bone Regeneration Applications” și “Functionalized Reduced Graphene Oxide-Based Nanocomposite Hydrogels for Enhanced Osteogenesis in Bone Tissue Engineering” acestea fiind acceptate spre publicare în revista Materials Advances Today (FI 8.0), respectiv în revista Advanced Healthcare Materials (Wiley, FI 10.0).

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

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

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

- Revizuirea și înaintarea spre publicare a articolului anexat “Recent Advances in Nanoparticles-Based Systems for the Treatment of Multiple Myeloma” în revista Results in Chemistry cu FI 4.2.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

PARTEA I

I.1. CAPITOL 1

I.1.1. Evaluarea proprietăților nanomecanice ale structurilor fabricate din GelMA, gellan metacrilat și diferite concentrații de oxid de grafenă

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

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

I.1.1.1. Introducere

Progresele înregistrate în domeniul printării tridimensionale (3D) medicale au deschis noi oportunități pentru fabricarea de structuri artificiale complexe pentru regenerare osoasă. Tehnologiile aditive permit realizarea de geometrii complexe, adaptate nevoilor pacientului, cu un nivel ridicat de precizie și personalizare, oferind un potențial considerabil pentru înlocuirea sau regenerarea structurilor osoase afectate [1], [2]. Cu toate acestea, un obstacol major în proiectarea scaffoldurilor pentru regenerare osoasă constă în încercarea de a reproduce fidel structura poroasă a osului natural, caracterizată printr-o organizare ierarhică, de la macro- la nano-scară. Această porozitate este esențială pentru promovarea vascularizației, proliferarea celulară și integrarea țesutului nou, însă implică un compromis semnificativ în ceea ce privește integritatea mecanică a structurilor printate [3]. Astfel, replicarea caracteristicilor morfologice ale osului trabecular duce, adesea, la scăderea rezistenței mecanice și la compromiterea comportamentului structural al scaffoldurilor, atât la nivel macroscopic, cât și la nivel nanostructural [4].

Utilizarea polimerilor naturali, precum gelatina și gellanul, este adesea preferată datorită biocompatibilității lor ridicate, capacității de degradare controlată și a interacțiunii favorabile cu celulele. Cu toate acestea, acești polimeri prezintă limitări semnificative din punct de vedere mecanic, în special în ceea ce privește rezistența la compresiune, modulul elastic și stabilitatea. Aceste limitări reduc considerabil aplicabilitatea scaffoldurilor pe bază de polimeri naturali în zonele cu solicitări mecanice ridicate [5], [6]. Pentru a depăși aceste limitări, o direcție de cercetare intens explorată în prezent constă în ranforsarea scaffoldurilor polimerice cu nanomateriale avansate, în special cu oxid de grafenă (GO). Acest nanomaterial bidimensional se remarcă printr-o structură lamelară stabilă, o suprafață chimică versatilă, ușor

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

funcționalizabilă, și proprietăți mecanice excepționale, care contribuie la îmbunătățirea semnificativă a rigidității, rezistenței mecanice și stabilității structurilor pentru regenerare osoasă [7], [8], [9].

În acest context, investigarea comportamentului mecanic la scară nano și micro devine esențială pentru înțelegerea completă a performanței scaffoldurilor ranforsate și pentru determinarea concentrației optime de GO care poate fi integrată în formulările printabile pentru a obține cea mai ridicată stabilitate mecanică. Astfel, s-au obținut probe pe bază de gellan metacrilat și gelatină metacrilată (GelMA), cu diferite concentrații de GO: 0% GO (GG); 0.125% GO (GG-12GO); 0.25% GO (GG-25GO); 0.50% GO (GG-50GO), pentru investigarea proprietăților nanomecanice.

I.1.1.2. Matertiale și metode

I.1.1.2.1. Metoda experimentală

Evaluarea proprietăților nanomecanice ale structurilor cu diferite concentrații de GO a fost realizată cu ajutorul echipamentului Nano Indenter G200 (Keysight Technologies, SUA), configurat cu un modul DCM și o opțiune de măsurare continuă a rigidității (CSM). Tehnica „G-Series DCM CSM Flat Punch Complex Modulus, Gel” din software-ul NanoSuite (versiunea 6.52.0) a fost utilizată pentru a efectua măsurătorile modulului de stocare (G') și de pierdere (G''). Această tehnică este specifică pentru măsurarea modulului complex G^* al polimerilor, gelurilor sau țesuturilor biologice moi la o singură frecvență. Astfel, această metodă permite atât măsurarea G' și G'' , cât și $\tan(\delta) = G''/G'$. De asemenea, s-a utilizat un indentator plat cu diamant DCM II cu rază de 97,7 μm , adecvat pentru caracterizarea materialelor moi cu comportament viscoelastic pronunțat. Frecvența de testare a fost stabilită la 110 Hz, o valoare optimă pentru simularea solicitărilor dinamice specifice mediului fiziologic. În plus, a fost aplicată o precompresie de 5 μm , necesară pentru a asigura un contact inițial stabil între indentator și suprafața probei, minimizând incertitudinile asociate artefactelor de suprafață. De asemenea, în calculul proprietăților nanomecanice, s-a considerat un coeficient Poisson de 0,5, valoare corespunzătoare materialelor cu de tip hidrogel sau compozitele polimerice moi. Pe fiecare probă au fost efectuate cinci măsurători distincte de indentare, distribuite uniform pe suprafața probelor. Această abordare permite obținerea unei evaluări statistice relevante și reducerea variabilității experimentale.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

I.1.1.3. Rezultate și discuții

Investigarea proprietăților nanomecanice ale structurilor obținute a evidențiat influența semnificativă a concentrației de GO asupra comportamentului viscoelastic al acestora. Au fost analizate patru formulări distincte: GG (fără GO), GG-12GO (0,125% GO), GG-25GO (0,25% GO) și GG-50GO (0,5% GO), pentru determinarea G' și G'' , ca indicatori ai comportamentului elastic, respectiv viscoelastic. Conform așteptărilor, toate probele au prezentat un comportament elastic cu $G' > G''$, specific materialelor pe bază de polimeri naturali (Tabelul 1). Pentru fiecare probă s-au înregistrat câte 5 măsurători, iar valorile ridicate obținute pentru deviația standard indică o structură anizotropică, adecvată pentru structuri destinate regenerării osoase.

Tabelul 1. Valorile G' și G'' determinate pentru structurile cu diferite concentrații de GO

Proba	G' (kPa)	G'' (kPa)	Media G' (kPa)	Deviația standard G' (kPa)	Media G'' (kPa)	Deviația standard G'' (kPa)
GG	6.153	3.392	9.3976	3.9563957	4.3168	1.1211359
	9.53	4.202				
	11.015	5.677				
	15.061	5.219				
	5.229	3.094				
GG-12GO	21.552	5.158	19.487	1.4397517	5.0072	0.6895373
	20.343	5.672				
	18.456	5.271				
	19.014	5.094				
	18.07	3.841				
GG-25GO	12.997	1.208	11.855	1.4173946	0.9466	0.2744627
	10.353	0.888				
	12.461	0.996				
	13.16	1.133				
	10.304	0.508				
GG-50GO	5.325	2.629	7.465	1.5236957	1.3364	1.3558843
	6.395	1.228				
	8.824	-0.168				
	8.423	0.201				
	8.358	2.792				

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

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 ilustrează grafic valorile medii ale G' și G'' pentru probele analizate, evidențiind influența concentrației de GO asupra comportamentului viscoelastic al scaffoldurilor investigate. Ambele module prezintă variații semnificative în funcție de conținutul de GO, ceea ce reflectă modificări substanțiale în structura și stabilitatea rețelei polimerice. Proba GG (0% GO) a prezentat o valoare medie a G' de 9.39 ± 3.95 kPa și G'' de 4.32 ± 1.12 kPa, indicând o rigiditate relativ scăzută a rețelei polimerice în absența oricărei forme de ranforsare. Adăugarea unei concentrații reduse de GO (0,125%, proba GG-12GO) a condus la o creștere semnificativă a G' până la 19.48 ± 1.43 kPa, indicând o consolidare substanțială a matricii datorată ranforsării cu GO. În același timp, G'' s-a menținut la o valoare stabilă (5.00 ± 0.68 kPa), indicând un echilibru favorabil între componentele elastice și viscoelastice ale materialului. Cu toate acestea, utilizarea unei concentrații mai mari de GO (0,25%, GG-25GO) a dus la o scădere a proprietăților nanomecanice, cu valori ale G' și G'' de 11.85 ± 1.41 kPa și respectiv, 0.94 ± 0.27 kPa, reprezentând o reducere a integrității rețelei și o pierdere a capacității de disipare a energiei mecanice. Această tendinșă s-a accentuat odată cu creșterea concentrației de GO la 0.50%, observându-se o scădere a acestor valori, G' fiind egal cu 7.46 ± 1.52 kPa și G'' cu 1.33 ± 1.35 kPa. Acest efect indică o destabilizare mecanică a structurilor odată cu utilizarea unei concentrații prea ridicate de GO, probabil cauzată de agregarea nanoparticulelor de GO și împiedicarea proceselor de reticulare chimică și fotopolimerizare.

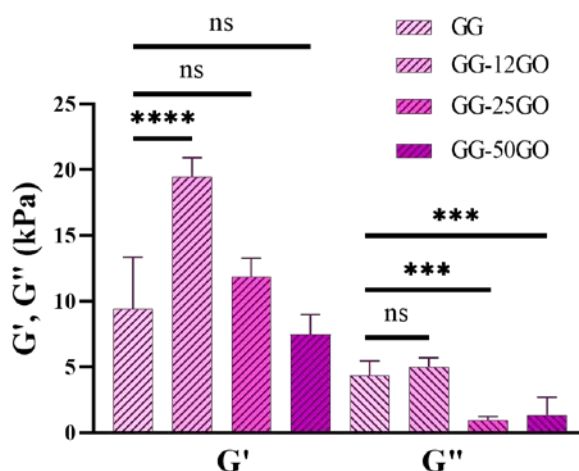


Figura 1. Proprietățile nanomecanice ale probelor pe bază de GelMA, gellan metacrilat și 0, 0.125, 0.25 și 0.50% GO (ns > 0.05, *** p < 0.0005, **** p < 0.0001).

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

I.1.1.4. Concluzii

Investigarea comportamentului mecanic la scară nano și micro reprezintă un demers esențial în dezvoltarea scaffoldurilor avansate pentru regenerarea țesutului osos. Ținând cont de complexitatea mediului fiziologic în care aceste structuri urmează să fie implantate, este necesară o caracterizare detaliată a proprietăților mecanice și viscoelastice pentru a asigura nu doar compatibilitatea biologică, ci și o performanță mecanică adecvată. Țesutul osos natural prezintă o structură ierarhică complexă, caracterizată de porozitate și rigiditate, iar replicarea acestor trăsături necesită o optimizare atentă a compoziției și arhitecturii la multiple niveluri. În acest context, studiul de față evidențiază modul în care diferite concentrații de GO influențează comportamentul nanomecanic al scaffoldurilor pe bază de gellan metacrilat și GelMA. Măsurarea parametrilor G' și G'' oferă o perspectivă clară asupra capacității materialului de a stoca și disipa energia mecanică, proprietăți esențiale pentru adaptarea la solicitările ciclice din mediul fiziologic.

Rezultatele experimentale de nanoindentare indică faptul că adăugarea unei concentrații reduse de GO (0,125%) a determinat o creștere semnificativă a G' , de la 9.39 ± 3.95 kPa în cazul probei control la 19.48 ± 1.43 kPa în cazul probei GG-12GO. Această dublare a rigidității rețelei indică o îmbunătățire clară a proprietăților mecanice prin integrarea GO, ca urmare a interacțiunii dintre grupările funcționale de pe suprafața GO și matricea polimerică. În același timp, G'' s-a menținut relativ constant (5.00 ± 0.68 kPa), sugerând că structura obținută nu și-a pierdut flexibilitatea necesară pentru a face față solicitărilor mecanice. Cu toate acestea, tendința de îmbunătățire a proprietăților mecanice nu s-a menținut și la concentrații mai ridicate de GO. La 0,25% GO, valorile G' și G'' scad considerabil (11.85 ± 1.41 kPa și 0.94 ± 0.27 kPa), iar la 0,50% GO (GG-50GO), se înregistrează o scădere suplimentară ($G' = 7.46 \pm 1.52$ kPa; $G'' = 1.33 \pm 1.35$ kPa). Aceste rezultate sugerează o limită optimă a concentrației de GO pentru obținerea unei ranforsări eficiente. Acest efect este probabil datorat agregării nanoparticulelor de GO, care, în loc să consolideze rețeaua, interferează cu procesele de fotopolimerizare și reticulare chimică, afectând omogenitatea și coeziunea internă a structurilor.

În concluzie, GO este un agent de ranforsare eficient pentru scaffolduri polimerice, însă eficiența sa este dependentă de dozaj și de distribuția omogenă în matrice. O concentrație de 0,125% GO pare a fi optimă pentru creșterea rigidității rețelei fără a compromite comportamentul viscoelastic. Aceste date sunt esențiale pentru dezvoltarea unor structuri

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE
POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

funcționale destinate aplicațiilor în regenerarea osoasă, unde este necesar un echilibru adecvat între duritate și flexibilitate pentru a susține proliferarea celulară și integrarea în țesutul gazdă.

Bibliografie

- [1] V. Mazzanti, L. Malagutti, and F. Mollica, “FDM 3D Printing of Polymers Containing Natural Fillers: A Review of their Mechanical Properties,” *Polymers* 2019, Vol. 11, Page 1094, vol. 11, no. 7, p. 1094, Jun. 2019, doi: 10.3390/POLYM11071094.
- [2] B. I. Oladapo, S. A. Zahedi, and A. O. M. Adeoye, “3D printing of bone scaffolds with hybrid biomaterials,” *Compos B Eng*, vol. 158, pp. 428–436, Feb. 2019, doi: 10.1016/J.COMPOSITESB.2018.09.065.
- [3] L. Chao, C. Jiao, H. Liang, D. Xie, L. Shen, and Z. Liu, “Analysis of Mechanical Properties and Permeability of Trabecular-Like Porous Scaffold by Additive Manufacturing,” *Front Bioeng Biotechnol*, vol. 9, p. 779854, Dec. 2021, doi: 10.3389/FBIOE.2021.779854/BIBTEX.
- [4] S. I. Roohani-Esfahani, P. Newman, and H. Zreiqat, “Design and Fabrication of 3D printed Scaffolds with a Mechanical Strength Comparable to Cortical Bone to Repair Large Bone Defects,” *Sci Rep*, vol. 6, no. 1, pp. 1–8, Jan. 2016, doi: 10.1038/SREP19468;TECHMETA=107,128,13;SUBJMETA=166,301,54,639,985,993;KWRD=BIOMEDICAL+ENGINEERING,IMPLANTS.
- [5] F. Donnalaja, E. Jacchetti, M. Soncini, and M. T. Raimondi, “Natural and Synthetic Polymers for Bone Scaffolds Optimization,” *Polymers* 2020, Vol. 12, Page 905, vol. 12, no. 4, p. 905, Apr. 2020, doi: 10.3390/POLYM12040905.
- [6] S. Bose, C. Koski, and A. A. Vu, “Additive manufacturing of natural biopolymers and composites for bone tissue engineering,” *Mater Horiz*, vol. 7, no. 8, pp. 2011–2027, Aug. 2020, doi: 10.1039/D0MH00277A.
- [7] Z. M. Wright, A. M. Arnold, B. D. Holt, K. E. Eckhart, and S. A. Sydlík, “Functional Graphenic Materials, Graphene Oxide, and Graphene as Scaffolds for Bone Regeneration,” *Regen Eng Transl Med*, vol. 5, no. 2, pp. 190–209, Jun. 2019, doi: 10.1007/S40883-018-0081-Z/FIGURES/5.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE
POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

- [8] Y. Wan, X. Chen, G. Xiong, R. Guo, and H. Luo, “Synthesis and characterization of three-dimensional porous graphene oxide/sodium alginate scaffolds with enhanced mechanical properties,” *Materials Express*, vol. 4, no. 5, pp. 429–434, Oct. 2014, doi: 10.1166/MEX.2014.1188.
- [9] H. Belaid *et al.*, “Development of new biocompatible 3D printed graphene oxide-based scaffolds,” *Materials Science and Engineering: C*, vol. 110, p. 110595, May 2020, doi: 10.1016/J.MSEC.2019.110595.

I.1.2. Evaluarea proprietăților reologice ale structurilor din GelMA, gellan metacrilat și diferite concentrații de oxid de grafenă

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

Subactivitatea 1.4. *Printarea 3D cu formulări printabile 4D și formulări printabile 4D cu celule.*

I.1.2.1. Introducere

Dezvoltarea accelerată a tehnologiilor de printare tridimensională (3D) în domeniul medical a generat noi direcții de cercetare pentru obținerea de structuri artificiale capabile să sprijine regenerarea țesutului osos. Printarea aditivă permite proiectarea unor arhitecturi complexe și personalizate, adaptate caracteristicilor specifice ale pacientului, cu o precizie dificil de atins prin metode convenționale [1], [2]. Această versatilitate oferă un potențial remarcabil pentru restaurarea funcțională a zonelor osoase afectate. Cu toate acestea, reproducerea fidelă a geometriilor complexe întâlnite în defectele osoase rămâne o provocare majoră [3].

Un factor determinant în depășirea acestor limitări îl constituie modularea atentă a proprietăților reologice ale formulărilor printabile utilizate. Parametri precum vâscozitatea, comportamentul tixotrop și capacitatea de menținere a formei după extrudare influențează direct atât precizia depunerii strat cu strat, cât și integritatea mecanică a structurilor obținute [4], [5]. Mai mult, aceste proprietăți reologice au un impact crucial asupra microstructurii interne, difuziei nutrienților și, implicit, asupra viabilității și diferențierii celulare. În absența unui echilibru optim între fluiditate și stabilitate, procesul de printare riscă fie să compromită fidelitatea geometrică, fie să genereze structuri fragile, inadecvate pentru integrarea în mediul biologic [6], [7].

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE
POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

Prin urmare, evaluarea atentă a comportamentului reologic continue o etapă cheie în determinarea concentrației optime de GO care poate fi integrată în formulările printabile pentru a obține cea mai ridicată fidelitate de printare. Astfel, s-au obținut probe pe bază de gellan metacrilat și gelatină metacrilată (GelMA), cu diferite concentrații de GO: 0% GO (GG); 0.125% GO (GG-12GO); 0.25% GO (GG-25GO); 0.50% GO (GG-50GO), pentru investigarea proprietăților reologice.

I.1.2.2. Matertiale și metode

I.1.2.2.1. Metoda experimentală

Evaluarea proprietăților reologice a fost realizată utilizând un reometru Kinexus Pro (Malvern Panalytical Ltd., Marea Britanie), echipat cu un element Peltier pentru controlul temperaturii și cu plăci paralele cu un diametru de 20 mm. Vâscozitatea ca funcție a vitezei de forfecare a fost investigată prin măsurători la o tensiune de forfecare constantă în intervalul de viteză de forfecare de 0,01 și 1000 s⁻¹. Modelul reologic Ostwald-de Waele în intervalul 0,1-100 s⁻¹ a fost calculat conform ecuației (I), unde τ este tensiunea de forfecare (Pa), K este indicele de consistență (Pa sⁿ), γ este viteza de forfecare (s⁻¹) și n este indicele de comportament al fluxului:

$$\tau = K\gamma^n \quad (I)$$

Capacitatea de recuperare a vâscozității formulărilor a fost evaluată prin monitorizarea modificărilor valorilor vâscozității într-un test de tixotropie în trei intervale. În prima etapă, s-a utilizat o viteză de forfecare redusă (0,1 s⁻¹) timp de 60 de secunde. În etapa a doua, s-a aplicat o viteză de forfecare ridicată (100 s⁻¹) timp de 10 secunde, iar în etapa a treia, viteza de forfecare a fost redusă la valoarea inițială de 0,1 s⁻¹ pentru încă 180 de secunde. Recuperarea vâscozitate a fost calculată după un minut folosind ecuația (II):

$$\text{Capacitatea de recuperare a vâscozității} = \frac{\text{vâscozitatea după 60 s}}{\text{vâscozitatea inițială}} \times 100 \quad (II)$$

Măsurătorile oscilatorii dinamice au fost efectuate în amplitudinea și frecvența de scanare. În amplitudinea de măsurare, frecvența a fost setată constantă la 1 Hz. Utilizând teste oscilatorii, modulul de stocare (G') și modulul de pierdere (G'') au fost determinate în regiunea

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

viscoelastică liniară (LVR) cu frecvențe de scanare variind de la 0,1 la 10 Hz. Toate măsurătorile au fost efectuate utilizând un spațiu fix (0,5 mm) la 40°C și s-a utilizat un sistem de blocare a apei pentru a preveni deshidratarea probelor.

I.1.2.3. Rezultate și discuții

Investigarea proprietăților reologice a formulărilor obținute a evidențiat influența semnificativă a concentrației de GO asupra acestora. Au fost analizate patru formulări distincte: GG (fără GO), GG-12GO (0,125% GO), GG-25GO (0,25% GO) și GG-50GO (0,5% GO), pentru determinarea comportamentului reologic. Figura 1 evidențiază variația vâscozității în funcție de viteza de forfecare aplicată. Se observă o tendință generală de scădere a vâscozității odată cu creșterea vitezei de forfecare, specifică materialelor cu comportament de tip *shear-thinning*, aspect esențial pentru procesele de extrudare utilizate în printarea 3D. Cu toate acestea, pentru proba control (GG), vâscozitatea se reduce mult mai accentuat, indicând o structură internă mai puțin stabilă și o rețea polimerică mai susceptibilă la rupere sub solicitare mecanică. În contrast, formulările ranforsate cu GO prezintă o diminuare mai moderată a vâscozității, ceea ce sugerează că prezența GO contribuie la consolidarea interacțiunilor dintre lanțurile polimerice, conferind materialului o rezistență mai ridicată la forfecare și o stabilitate structurală crescută pe parcursul procesului de printare.

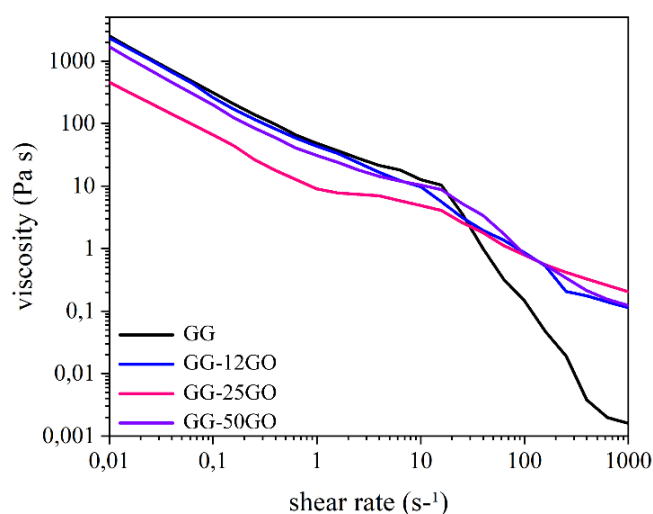


Figura 1. Analiza vâscozității în funcție de viteza de forfecare

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

Pentru a caracteriza mai detaliat comportamentul reologic al formulărilor, s-a evaluat regiunea viscoelastică liniară (LVR) prin test de *amplitude sweep*. În cadrul domeniului LVR (Figura 2), toate formulările analizate au manifestat un comportament predominant elastic, ceea ce este esențial pentru stabilitatea structurală în timpul printării 3D bazate pe extrudare. Comportamentul observat poate fi atribuit formării de interacțiuni fizice și legături între componentele matricii, care conferă coeziune internă și rezistență mecanică materialului. Menținerea proprietăților elastice în LVR indică faptul că materialul poate suporta deformări moderate fără degradarea arhitecturii depuse strat cu strat, aspect critic pentru obținerea de scaffolduri tridimensionale precise și funcționale.

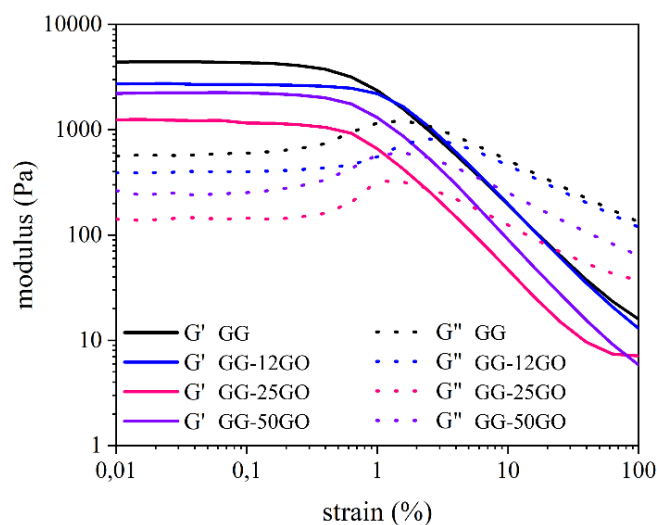


Figura 2. Comportamentul reologic în funcție de amplitudinea deformației

În ultima etapă, s-a realizat o analiză pentru măsurarea frecvenței în cadrul intervalului LVR pentru a evalua stabilitatea comportamentului gel al formulărilor (Figura 3). În intervalul de frecvență investigat (0,1–10 Hz), modulele elastice (G') și viscoase (G'') au rămas aproape constante, indicând o independență față de frecvență caracteristică materialelor de tip gel. Acest comportament sugerează prezența unei rețele interne stabile, capabile să mențină coeziunea și integritatea structurală sub solicitări variabile de deformare. Menținerea $G' > G''$ pe tot intervalul confirmă dominanța componentei elastice și indică faptul că materialele pot susține retenția formei după extrudare, un aspect esențial pentru printarea 3D a substituenților osoși.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

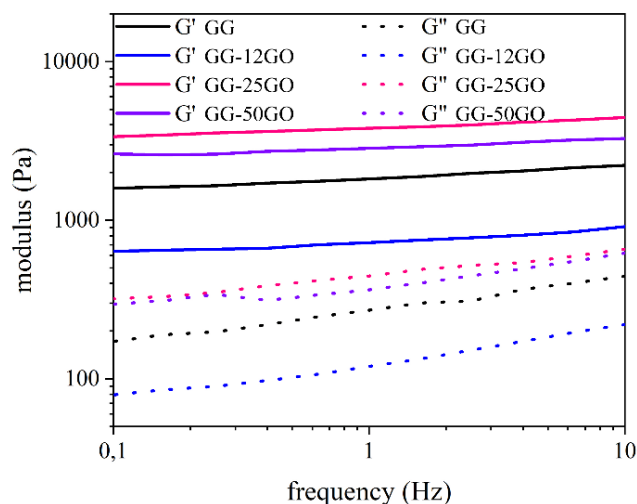


Figura 3. Frecvența în cadrul intervalului LVR

I.1.2.4. Concluzii

Concluziile studiului privind proprietățile reologice ale formulărilor analizate evidențiază importanța critică a concentrației GO asupra comportamentului materialelor destinate printării 3D pentru regenerarea osoasă. Au fost investigate patru formulări distincte: GG (fără GO), GG-12GO (0,125% GO), GG-25GO (0,25% GO) și GG-50GO (0,5% GO), pentru a determina modul în care prezența și concentrația GO influențează vâscozitatea, comportamentul viscoelastic și stabilitatea structurală a modelelor printate. Analiza reologică inițială, realizată prin măsurarea variației vâscozității în funcție de viteza de forfecare, a relevat un comportament de tip *shear-thinning* pentru toate formulările, caracteristic materialelor care trebuie extrudate prin printare 3D. Această proprietate este esențială, deoarece facilitează fluxul controlat al materialului prin duza imprimantei, permițând depunerea precisă strat cu strat. Cu toate acestea, diferențele dintre formulări au fost evidente, iar proba control GG a prezentat o scădere mult mai accentuată a vâscozității, indicând o rețea polimerică mai puțin stabilă și susceptibilă la rupere sub solicitare mecanică. Această observație subliniază rolul GO nu doar ca agent de ranforsare, ci și ca factor care influențează procesabilitatea materialului, esențială pentru obținerea unor structuri tridimensionale funcționale și precise.

Evaluarea mai aprofundată a comportamentului viscoelastic a fost realizată prin determinarea LVR folosind testul de *amplitude sweep*. În această regiune, toate formulările au prezentat un comportament predominant elastic, necesar pentru stabilitatea straturilor depuse.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

Această proprietate este critică pentru printarea 3D, deoarece permite materialului să suporte deformări moderate fără pierderea integrității structurale, asigurând astfel menținerea fidelității geometrice a structurilor și susținerea viabilității celulare în aplicabilitate biologică.

În etapa finală, s-a efectuat analiza pentru măsurarea frecvenței în cadrul intervalului LVR pentru a evalua stabilitatea comportamentului gel al formulărilor. În intervalul de frecvență 0,1–10 Hz, modulele G' și G'' au rămas aproape constante, demonstrând independența față de frecvență și confirmând stabilitatea rețelei interne. Dominanța $G' > G''$ pe întreg intervalul indică faptul că toate formulările posedă caracteristici de tip gel stabil, capabile să mențină forma structurilor după extrudare. Această stabilitate este esențială nu doar pentru procesele de printare 3D, ci și pentru performanța mecanică și biologică a substituenților finali.

În concluzie, studiul evidențiază rolul concentrației de GO în modularea proprietăților reologice ale formulărilor pentru printarea 3D. Formulările cu GO au demonstrat o vâscozitate mai stabilă, un comportament elastic mai pronunțat și o rețea internă mai eficientă comparativ cu proba control, indicând că adăugarea GO poate fi utilizată strategic pentru optimizarea procesabilității și a stabilității structurale. Rezultatele obținute oferă o bază solidă pentru dezvoltarea de materiale personalizate, capabile să satisfacă cerințele mecanice și biologice necesare în regenerarea osoasă, subliniind importanța controlului fin al proprietăților reologice în proiectarea substituenților osoși funcționali.

Bibliografie

- [1] U. Jammalamadaka and K. Tappa, “Recent Advances in Biomaterials for 3D Printing and Tissue Engineering,” *Journal of Functional Biomaterials* 2018, Vol. 9, Page 22, vol. 9, no. 1, p. 22, Mar. 2018, doi: 10.3390/JFB9010022.
- [2] A. Zaszczynska, M. Moczulska-Heljak, A. Gradys, and P. Sajkiewicz, “Advances in 3D Printing for Tissue Engineering,” *Materials* 2021, Vol. 14, Page 3149, vol. 14, no. 12, p. 3149, Jun. 2021, doi: 10.3390/MA14123149.
- [3] Y. Feng *et al.*, “Application of 3D Printing Technology in Bone Tissue Engineering: A Review,” *Curr Drug Deliv*, vol. 18, no. 7, pp. 847–861, Nov. 2020, doi: 10.2174/1567201817999201113100322/CITE/REFWORKS.
- [4] S. Bom, R. Ribeiro, H. M. Ribeiro, C. Santos, and J. Marto, “On the progress of hydrogel-based 3D printing: Correlating rheological properties with printing behaviour,” *Int J Pharm*, vol. 615, p. 121506, Mar. 2022, doi: 10.1016/J.IJPHARM.2022.121506.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

[5] S. Zhu, M. A. Stieger, A. J. van der Goot, and M. A. I. Schutyser, “Extrusion-based 3D printing of food pastes: Correlating rheological properties with printing behaviour,” *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, vol. 58, p. 102214, Dec. 2019, doi: 10.1016/J.IFSET.2019.102214.

[6] M. Yan and H. A. Awad, “Optimizing rheological properties for printability: low-temperature extrusion 3D printing of hydroxyapatite-polycaprolactone mixture inks for bone tissue engineering,” *Front Mater*, vol. 10, p. 1239692, Aug. 2023, doi: 10.3389/FMATS.2023.1239692/BIBTEX.

I.1.3. Sinteza și printarea 3D a formulărilor printabile pe bază de gelatină, nanofibre de celuloză și K-carragenan

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

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

I.1.3.1. Introducere

Necesitatea dezvoltării unor soluții inovatoare pentru regenerarea țesutului osos afectat de patologii severe, precum mielomul multiplu, reprezintă una dintre principalele direcții de interes în domeniul medicinei regenerative. Limitările terapilor convenționale, atât în ceea ce privește capacitatea de regenerare, cât și integrarea structurală și funcțională în organism, au determinat orientarea cercetării biomedicale către utilizarea unor tehnologii emergente, printre care se evidențiază printarea 3D. Această tehnologie, combinată cu materiale biocompatibile și bioactive de înaltă performanță, permite obținerea de structuri personalizate (scaffolduri) cu arhitecturi controlate, capabile să reproducă microstructura osului natural și să ofere suport pentru procesele de regenerare tisulară. Proiectul REOSTEOMi Advanced & Personalized Solutions for Bone Regeneration and Complications Associated with Multiple Myeloma are ca obiectiv principal dezvoltarea unor substituenți osoși personalizați, proiectați pentru a furniza suport mecanic și integrare biologică optimă, dar și pentru a permite, atunci când este necesar, încorporarea unor funcționalități terapeutice suplimentare. În cadrul proiectului, activitățile au fost orientate spre formularea și optimizarea unor compoziții bioactive compatibile cu tehnologiile de bioprintare prin extrudare la temperaturi blânde, ceea ce asigură păstrarea integrității materialelor și compatibilitatea cu mediul biologic.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

Pentru atingerea acestor obiective, au fost selectate materiale naturale precum gelatina, κ -carragenanul și nanofibrele de celuloză, datorită proprietăților lor reologice și mecanice, dar și a capacității de a crea un microambient favorabil interacțiunii celulelor și proceselor regenerative. Optimizarea acestor formulări, alături de stabilirea parametrilor de printare adecvați, a permis controlul asupra arhitecturii interne a scaffoldurilor, stabilității lor structurale în medii biologice și potențialului de integrare în țesutul osos. Astfel, această etapă s-a concentrat pe realizarea de multiple încercări de printare 3D, având ca scop obținerea unor seturi de scaffoldurilor necesare analizelor viitoare.

I.1.3.2. Materiale și sinteză.

I.1.3.2.1. Materiale utilizate

Gelatină obținută din piele de pește, κ -carragenan, 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).

I.1.3.2.2. Sinteza formulărilor printabile

Formulările obținute pentru dezvoltarea scaffoldurilor au fost concepute pe baza unei matrice polimerice naturale, codificate cu denumirea GCK, care reflectă compoziția de bază utilizată: G -gelatină, K- κ -carragenan și C-nanofibre de celuloză (CNF).

Tabelul 1 – Primele concentrațiile utilizate în realizarea formulărilor printabile.

COD	Gelatină	Nanofibre de celuloză	K- carragenan	Clorură de calciu	Genipin
GCK	4.3%	0.2%	1.15%	2%	0.1%

În urma testelor de printare s-a ajuns la concluzia ca cea mai adecvata formulare are la bază compoziția masică unde: 0.4 g κ -carragenan, 2g gelatină, și 7 ml fază lichidă de CNF-uri 1%, au fost adăugate treptat în 35 ml de apă, în ordinea menționată. Temperatura a fost menținută constantă la 40 °C, pentru a facilita solubilizarea gelatinei în soluția conținând nanofibre de celuloză și pentru a preveni denaturarea matricei polimerice, menținând totodată amestecul sub agitare continuă. După dizolvarea gelatinei, s-a adăugat κ -carragenanul, iar soluția a fost agitată în continuare timp de 2 ore.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

Strategia de sinteză a urmărit astfel, obținerea unor amestecuri cu reologie adecvată procesului de bioprintare prin extrudare, dar și cu stabilitate structurală suficientă pentru menținerea arhitecturii scaffoldurilor în medii apoase. În acest scop, s-au realizat serii succesive de formulări, în cadrul cărora concentrațiile relative de gelatină, κ -carragenan și CNF au fost ajustate gradual pentru a identifica raporturile optime între componente. Gelatina a fost inclusă ca element majoritar, având rol de matrice bioactivă și biocompatibilă, capabilă să favorizeze interacțiunea cu celulele. κ -carragenanul a fost utilizat pentru a îmbunătăți proprietățile mecanice și stabilitatea scaffoldurilor în medii umede, contribuind în același timp la menținerea unei vâscozități adecvate extrudării. Nanofibrele de celuloză (CNF) au fost introduse în concentrații reduse, dar cu impact semnificativ asupra reologiei și rezistenței mecanice, datorită structurii lor fibrilare și capacității de a forma o rețea de întărire în compoziție.

Formulările obținute au fost ulterior printate 3D, utilizând parametri tehnici detaliați în Tabelul 2. Pentru asigurarea stabilității structurale și obținerea unor scaffolduri cu rezistență mecanică și integritate dimensională superioară, probele printate au fost supuse unui protocol de reticulare în două etape: reticulare ionică prin imersie într-o soluție de clorură de calciu 2% (10 minute), pentru consolidarea rapidă a rețelei polimerice și menținerea arhitecturii tridimensionale; și reticulare chimică prin incubare într-o soluție de genipin 0,1% (24 ore), pentru obținerea unei stabilizări pe termen lung, cu potențial de a îmbunătăți atât proprietățile mecanice, cât și rezistența în medii apoase. Probele astfel reticulate au fost ulterior congelate și pregătite pentru procesul de liofilizare, cu scopul de a obține structuri poroase stabile, adecvate analizelor ulterioare.

1.1.3.2.3. Printarea formulărilor sintetizate

Printarea formulărilor sintetizate a fost realizată utilizând imprimanta CELLINK, prin tehnica extrudării pneumatice. În funcție de vâscozitatea hidrogelului obținut, parametrii de printare (presiunea de extrudare și viteza de deplasare a capului de printare) au fost ajustați pentru a evalua influența acestora asupra calității și stabilității structurilor obținute.

În urma testelor preliminare s-a constatat că utilizarea acului 22G oferă cea mai bună printabilitate, asigurând o extrudare continuă și controlată, fără întreruperi sau blocaje, iar constructele rezultate au prezentat o fidelitate geometrică superioară, fiind cele mai apropiate ca formă și dimensiuni de modelul de referință. Această configurație a permis obținerea unor structuri stabile, cu margini bine definite și o bună coeziune a filamentelor depuse, ceea ce indică faptul că diametrul acului de 22G reprezintă opțiunea optimă pentru formulările testate.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE
POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

I.1.3.3. Rezultate și discuții

Subactivitatea 1.4. *Printarea 3D cu formulări printabile 4D și formulări printabile 4D cu celule.*

Rezultatele printării 3D sunt sintetizate în tabelele de mai jos, acestea reunind datele obținute în urma experimentelor de testare a diferitelor formulări de hidrogel. Parametrii monitorizați includ presiunea de extrudare, viteza de deplasare a capului de printare, diametrul acelor utilizate, precum și fidelitatea geometrică a structurilor obținute comparativ cu modelul 3D de referință. De asemenea, au fost notate observații privind continuitatea extrudării, stabilitatea constructelor și aspectul marginilor filamentelor depuse.

Tabelul 2 evidențiază performanța formulării GCK (martor), care a servit drept probă de referință pentru comparația ulterioară a rezultatelor. Această formulare a permis o extrudare relativ stabilă, însă fidelitatea constructelor a fost limitată, necesitând optimizarea compoziției pentru a îmbunătăți calitatea structurilor printate.

Prima formulare experimentală testată (Set 1) nu a permis realizarea printării în parametri optimi, înregistrându-se dificultăți atât la nivelul extrudării, cât și în menținerea formei dorite. În consecință, sinteza a fost reluată prin ajustarea concentrațiilor componentelor de bază (gelatină, κ -carragenan și nanofibre de celuloză), în vederea identificării unei compoziții care să ofere o combinație echilibrată între vâscozitate, extrudabilitate și stabilitate structurală.

Rezultatele obținute pentru formulările optimizate sunt prezentate în tabelele următoare, acestea demonstrând îmbunătățiri semnificative atât în ceea ce privește fidelitatea geometrică, cât și în calitatea generală a printării. Astfel, se poate observa o corelație directă între ajustarea concentrațiilor componentelor hidrogelului și comportamentul acestuia în timpul procesului de printare 3D, ceea ce subliniază importanța etapei de optimizare în obținerea unor suporturi 3D cât mai apropiate de modelul de referință.

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

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

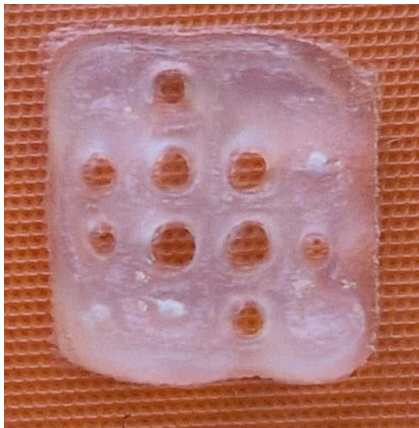
Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

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. Optimizarea parametrilor de printare pentru compoziția GCK1.

GCK1			
Concentrații: 4.3% Gelatină/0.2% Nanofibre celuloză/1.15% K-carragenan			
Nr. Crt	Parametrii de printare	Imagini printare	Observații printare
Set 1			
1	Diametru acului de printare: 22G Temperatură: 37°C Presiune: 30kPa		Filamentul extrudat nu asigură uniformitate, soluția prezentând o vâscozitate scăzută și manifestând tendința de a forma o acumulare de lichid la capătul filamentului extrudat.
2	Dimensiunile selectate: 10x10x3 mm Diametru acului de printare: 22G Procentul de umplere: 32% Temperatură: 37°C Presiune: 30kPa Viteza de printare: 10 mm/s		Presiunea de 30 kpa a condus la obținerea unei structuri în care pori sunt ovali și încărcăți cu material, de asemenea viteza de 10 mm/s a condus la obținerea unei forme exterioare a scaffoldului neregulată, totodată dorită catității de material extrudare există o tendință de colapsare a straturilor. astfel se indică faptul că formularea

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

			<i>printabilă are o vâscozitate mică iar parametrii nu sunt adecvați pentru printarea acesteia.</i>
3	Dimensiunile selectate: 10x10x1 mm Diametru acului de printare: 22G Procentul de umplere: 32% Temperatură: 37°C Presiune: 25kPa Viteza de printare: 10 mm/s		<i>Scăderea presiunii de printare la 25 kPa nu a condus la obținerea unei structuri mai bine definite, porii rămânând ovali, iar structura exterioară prezentând în continuare neregularități, din cauza cantității mari de material extrudat.</i>
4	Dimensiunile selectate: 10x10x1 mm Diametru acului de printare: 22G Procentul de umplere: 18% Temperatură: 37°C Presiune: 20 kPa Viteza de printare: 10mm/s		<i>De această dată, scăderea presiunii la 20 kPa a condus la obținerea unei structuri cu contur exterior mai bine definit și cu un număr redus de pori încărcăți cu material, însă porii prezintă în continuare tendințe de ovalizare, indicând că, deși reducerea presiunii a îmbunătățit</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

			<i>stabilitatea geometrică a conturului exterior, vâscozitatea formulării rămâne insuficientă pentru a menține porii complet pătrați.</i>
5	Dimensiunile selectate: 10x10x1 mm Diametru acului de printare: 22G Procentul de umplere: 32% Temperatură: 37°C Presiune: 20 kPa Viteza de printare: 12 mm/s		<i>Presiunea de printare a fost menținută la 20 kPa, însă viteza de printare a fost crescută la 12 mm/s. Structura obținută prezintă un contur exterior mai regulat și un număr redus de pori încărcăți cu material, însă aceștia sunt în continuare prezenți și manifestă o formă ușor ovalizată.</i>

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

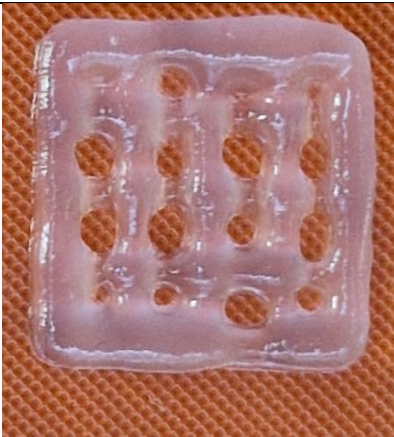
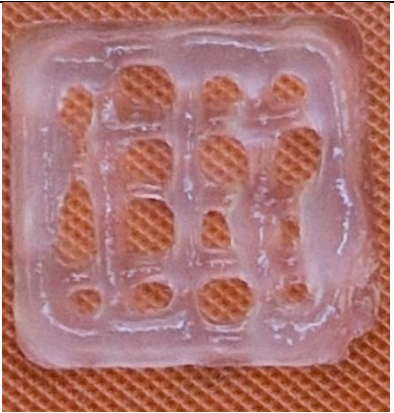
Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

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: 10x10x1 mm Diametru acului de printare: 22G Procentul de umplere: 32% Temperatură: 37°C Presiune: 20kPa Viteza de printare: 13 mm/s		<i>Viteza de printare a fost crescută la 13 mm/s, iar presiunea a fost menținută la 20 kPa. S-a obținut un scaffold cu aceleași particularități ca structura precedentă, însă se observă o tendință ca porii să fie mai puțin încărcăți cu material.</i>
7	Dimensiunile selectate: 10x10x1 mm Diametru acului de printare: 22G Procentul de umplere: 32% Temperatură: 37°C Presiune: 15 kPa Viteza de printare: 13mm/s		<i>Ca urmare, presiunea a fost redusă la 15 kPa, menținându-se viteza la 13 mm/s. Se poate observa că structura prezintă pori mai puțin încărcăți cu material, cu o tendință de a fi pătrați; totuși, datorită vitezei prea mari de printare, apar întreruperi ale filamentului, afectând structura de bază.</i>

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

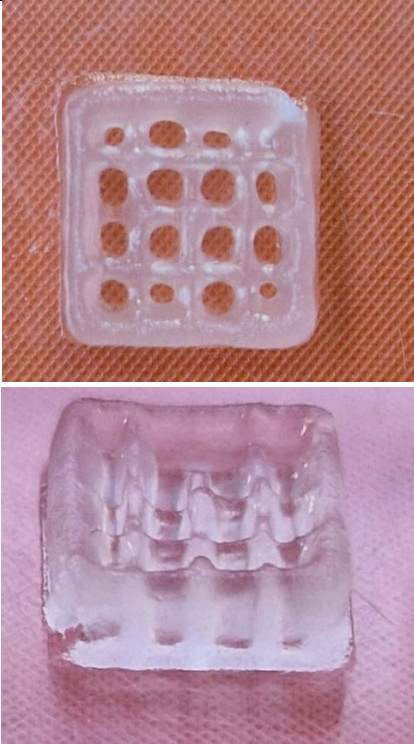
Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

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

8	Dimensiunile selectate: 10x10x1 mm Diametru acului de printare: 22G Procentul de umplere: 32% Temperatură: 37°C Presiune: 15 kPa Viteza de printare: 10mm/s		<i>Presiunea a fost menținută la 15 kPa, iar viteza a fost redusă la 10 mm/s, conducând la obținerea unei structuri cu pori semi-oval și contur exterior asemănător modelului CAD. Totuși, din cauza vitezei încă relativ mari, apar întreruperi ale filamentului, ceea ce se reflectă prin porii inferiori care nu sunt complet conectați.</i>
9	Dimensiunile selectate: 10x10x3 mm Diametru acului de printare: 22G Procentul de umplere: 32% Temperatură: 37°C Presiune: 15 kPa Viteza de printare: 8mm/s		<i>Scăderea vitezei de printare a condus la formarea unui scaffold cu pori semi-oval, încărcăți cu material la extremități, ceea ce indică faptul că presiunea de printare este prea mare pentru viteza utilizată.</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

În cadrul testelor efectuate cu această compoziție, filamentul obținut la extrudare nu a prezentat o uniformitate constantă, soluția având o vâscozitate relativ scăzută și tendința de a forma acumulări de lichid la capătul extrudat. Acest comportament sugerează că parametrii de lucru standard (22G, 37°C, 30 kPa, 10 mm/s) nu asigură o depunere stabilă.

În proba 1 (30 kPa, 10 mm/s, 22G, 10×10×3 mm), structura obținută a prezentat pori ovali și încărcăți cu material, iar forma exterioară a scaffoldului a fost neregulată. Supradepunerea excesivă a materialului a condus la tendințe de colaps ale straturilor, indicând o vâscozitate insuficientă pentru a susține stabilitatea geometrică. În proba 2 (25 kPa, 10 mm/s, 22G, 10×10×3 mm), reducerea presiunii nu a îmbunătățit fidelitatea geometrică, porii rămânând ovali, iar structura exterioară prezentând neregularități cauzate de extrudarea excesivă a materialului. În proba 3 (20 kPa, 10 mm/s, 25G, 10×10×1 mm), s-a observat o ușoară îmbunătățire a conturului exterior și un număr redus de pori încărcăți cu material. Totuși, porii au continuat să manifeste tendințe de ovalizare, confirmând că vâscozitatea redusă nu permite menținerea unei geometrii pătrate. În proba 4 (20 kPa, 12 mm/s, 25G), creșterea vitezei de printare a dus la un contur exterior mai regulat și la reducerea cantității de material acumulat în pori. Cu toate acestea, porii au rămas parțial ovalizați. În proba 5 (20 kPa, 13 mm/s, 25G), structura a prezentat aceleași particularități ca în proba precedentă, cu o ușoară reducere suplimentară a încărcării porilor cu material. În proba 6 (15 kPa, 13 mm/s, 25G), scăderea presiunii a condus la pori mai puțin încărcăți și cu tendință spre formă pătrată, însă viteza ridicată a cauzat întreruperi ale filamentului, afectând continuitatea structurii. În proba 7 (15 kPa, 10 mm/s, 25G), structura obținută a avut pori semi-ovalizi și un contur exterior asemănător modelului CAD, dar au fost observate întreruperi ale filamentului, în special la nivelul porilor inferiori, care nu au fost complet conectați. În proba 8 (15 kPa, 8 mm/s, 25G, 10×10×3 mm), scăderea vitezei de printare a determinat formarea unor pori semi-ovalizi încărcăți cu material, ceea ce indică faptul că presiunea aplicată a fost prea mare pentru viteza utilizată.

În concluzie, formularea 4,3% Gelatină / 0,2% Nanofibre celuloză / 1,15% κ-carragenan a prezentat limitări în ceea ce privește fidelitatea geometrică a scaffoldurilor, datorită vâscozității insuficiente care a condus fie la supradepunere, fie la întreruperi ale filamentului. Deși s-au observat mici îmbunătățiri prin ajustarea presiunii și vitezei, structurile rezultate au rămas instabile. Astfel, formularea necesită în continuare optimizare, iar parametrii recomandați pentru printare sunt prezentați în Tabelul 3, unde este indicată varianta optimizată utilizând 2 g gelatină, 0.4 g κ-carragenan și 7 ml nanofibre de celuloză (1%) dizolvate în 18 ml de apă.

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

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

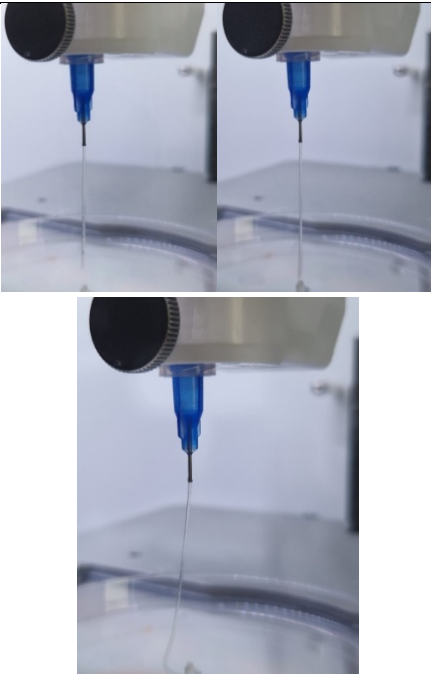
Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

Tabelul 3. Optimizarea parametrilor de printare pentru compoziția GCK1 (martor).

GCK2 (control)			
Concentrații: 8% Gelatină/0.28% Nanofibre celuloză/1.6% K-carragenan			
Nr. Crt	Parametrii de printare	Imagini printare	Observații printare
Set2			
1	Extrudarea filamentului Diametru acului de printare: 22G Temperatură: 37°C Presiune: 40 kPa		Filamentul ilustrat în imagine demonstrează o extrudare uniformă și continuă a formulării testate, ceea ce evidențiază o bună corelare între proprietățile reologice ale hidrogelului și parametrii de printare utilizați. Se remarcă obținerea unei structuri omogene, fără discontinuități vizibile sau variații semnificative de grosime, aspect care confirmă stabilitatea materialului în timpul procesului de depunere.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

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: 15x15x5 mm Diametru acului de printare: 22G Procentul de umplere: 20% Temperatură: 37°C Presiune: 40kPa Viteza de printare: 10 mm/s		<i>Se poate observa că presiunea de printare a fost prea ridicată în raport cu vâscozitatea soluției utilizate, ceea ce a condus la obținerea unui scaffold cu pori neuniformi și parțial obstrucționați de material.</i>
3	Dimensiunile selectate: 15x15x5 mm Diametru acului de printare: 22G Procentul de umplere: 20% Temperatură: 37°C Presiune: 20 kPa Viteza de printare: 10 mm/s		<i>Reducerea presiunii de extrudare la 20 kPa a condus la formarea unor structuri cu pori bine definiți, însă cu întreruperi de material din cauza presiunii scăzute, ceea ce a determinat blocarea acului de printare.</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: 15x15x5 mm Diametru acului de printare: 22G Procentul de umplere: 20% Temperatură: 37°C Presiune: 25 kPa Viteza de printare: 10 mm/s		<i>Creșterea presiunii de extrudare la 25 kPa a condus la formarea unor structuri cu pori bine definiți; totuși, viteza de deplasare a acului de 10 mm/s a determinat apariția unor întreruperi ale materialului la marginile scaffoldului, în special la colțuri, ca urmare a combinației dintre viteza prea mare și presiunea insuficientă.</i> <i>Straturile unde sunt porii interior au o tendiță de colapsare .</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: 15x15x5 mm Diametru acului de printare: 22G Procentul de umplere: 20% Temperatură: 37°C Presiune: 25 kPa Viteza de printare: 8 mm/s		<i>Presiunea a fost menținută la 25 kPa, însă viteza a fost redusă la 8 mm/s, ceea ce a condus la obținerea unui model asemănător celui CAD, cu pori aproape drepecți. Totuși, din cauza presiunii scăzute, în anumite secțiuni ale scaffoldului filamentul apare mai subțire decât în alte zone, ceea ce determină o neuniformitate dimensională atât a straturilor, cât și a porilor. De asemenea, straturile interioare care nu o susținere datorită părții</i>

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

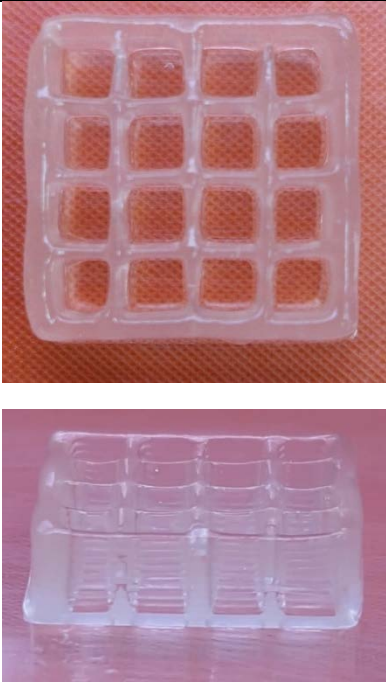
Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

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

			exterioare a scaffoldului au o tendiță de colapsare.
6	Dimensiunile selectate: 15x15x5 mm Diametru acului de printare: 22G Procentul de umplere: 20% Temperatură: 37°C Presiune: 30 kPa Viteza de printare: 8 mm/s		Creșterea presiunii de printare a condus la formarea unor scaffolduri similare cu modelul CAD, porii având formă pătrată, fără colțuri sau muchii rotunjite. De asemenea, se observă că straturile sunt mai bine definite și mai rezistente în plan superior, fiind uniforme și necolapsate sub propria greutate.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

7	Dimensiunile selectate: 15x15x5 mm Diametru acului de printare: 22G Procentul de umplere: 20% Temperatură: 37°C Presiune: 30 kPa Viteza de printare: 7 mm/s		<i>Presiunea a fost menținută la 30 kPa, însă viteza a fost redusă la 7 mm/s. In ansamblu, se observă pori de formă pătrată, însă straturile prezintă o tendință de colapsare din cauza cantității mai mari de material extrudat datorită vitezei reduse.</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

8	Dimensiunile selectate: 15x15x5 mm Diametru acului de printare: 22G Procentul de umplere: 20% Temperatură: 37°C Presiune: 30 kPa Viteza de printare: 6.5mm/s		<i>Presiunea a fost menținută la 30 kPa, însă viteza a fost redusă la 6,5 mm/s. De această dată, porii prezintă o tendință de ovalizare, iar straturile manifestă, de asemenea, o tendință de colapsare din cauza cantității mai mari de material extrudat la viteze reduse.</i>
---	--	---	---

În cadrul testelor efectuate cu compoziția GCK (5,6% gelatină, 0,26% CNF-uri și 1,5% κ -carragenan), filamentul obținut la extrudare a prezentat, în toate cazurile, continuitate și uniformitate bune la ieșirea din ac, ceea ce confirmă compatibilitatea reologică a hidrogelului cu parametrii de lucru. Totuși, variațiile de presiune și viteză au influențat semnificativ fidelitatea geometrică a structurilor finale.

În proba 1, extrudarea filamentului la 40 kPa a demonstrat un flux constant, uniform și omogen, fără discontinuități sau fluctuații majore de grosime, ceea ce confirmă stabilitatea materialului pe parcursul procesului de depunere. Acest comportament arată că formularea are proprietăți reologice adecvate pentru printare, iar diametrul acului (22G) a fost potrivit pentru menținerea unui flux controlat.

În proba 2, utilizarea aceluiași parametri de presiune (40 kPa) și viteză (10 mm/s), dar aplicată pe structura $10 \times 10 \times 1$ mm, a condus la formarea unui scaffold cu pori neuniformi și parțial obturați de material. Deși filamentul s-a menținut continuu, presiunea ridicată a determinat o extrudare excesivă, rezultând o supradepunere a materialului și o pierdere a fidelității față de modelul CAD.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

Reducerea presiunii la 20 kPa (proba 3) a îmbunătățit aspectul porilor, care au devenit mai bine definiți, însă fluxul de material a devenit instabil. Filamentul, deși inițial corect, a suferit întreruperi datorită presiunii insuficiente, ceea ce a dus la zone discontinue și chiar la blocarea acului de printare. Acest rezultat sugerează că presiunea minimă pentru o extrudare stabilă trebuie să depășească 20 kPa.

În proba 4, creșterea presiunii la 25 kPa și menținerea vitezei de 10 mm/s au condus la structuri cu pori bine conturați, însă viteza ridicată în raport cu presiunea a provocat întreruperi ale filamentului în zonele marginale, în special la colțuri. Filamentul a rămas în general uniform, dar la intersecțiile structurii s-au observat zone de discontinuitate, iar porii interiori au prezentat tendință de colapsare.

În proba 5, menținerea presiunii la 25 kPa și reducerea vitezei la 8 mm/s au adus o îmbunătățire semnificativă. Structura obținută a fost mai apropiată de modelul CAD, porii au fost aproape drepecți, iar filamentul a rămas stabil pe direcțiile de printare. Totuși, presiunea relativ scăzută a determinat ca, în unele zone, grosimea filamentului să fie mai mică, ceea ce a generat o neuniformitate dimensională a straturilor și o tendință de colaps a regiunilor interioare, unde sprijinul era insuficient.

La 30 kPa și 8 mm/s (proba 6) s-au obținut cele mai bune rezultate din seria testată. Filamentul s-a depus uniform, porii au avut formă pătrată, bine conturată, iar straturile au fost stabile și necolapsate, inclusiv în partea superioară a structurii. De asemenea, grosimea filamentului a fost constantă, fără variații majore, ceea ce confirmă o bună corelare între presiune și viteză.

În proba 7 (30 kPa și 7 mm/s), s-a observat că, deși porii au rămas pătrați și filamentul a fost stabil, cantitatea mai mare de material extrudat la viteză mai redusă a determinat tendința de colapsare a straturilor, mai ales în zonele interioare. Astfel, uniformitatea generală a fost afectată.

În proba 8 (30 kPa și 6,5 mm/s), excesul de material rezultat din reducerea vitezei a condus la ovalizarea porilor și la colaps parțial al straturilor. Deși filamentul a rămas continuu și bine format, suprapunerea materialului a compromis stabilitatea geometrică a scaffoldului.

În concluzie, cele mai bune rezultate pentru această formulare au fost obținute în proba 6, parametrii optimi fiind 30 kPa și 8 mm/s, condiții în care formele porilor și rezoluția au fost foarte apropiate de modelul CAD. Per ansamblu, filamentul a prezentat în toate cazurile o calitate bună la extrudare, fiind uniform, continuu și fără variații bruște de grosime. În acest sens, în Tabelul 4 sunt prezentate printările realizate după ajustarea parametrilor cu aceeași formulare de mai sus.

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

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

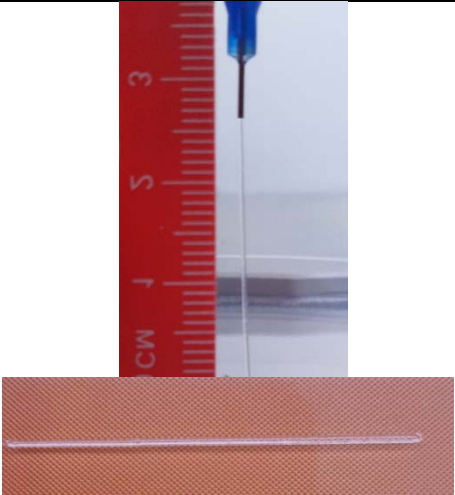
Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

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. Optimizarea parametrilor de printare pentru compoziția GCK2.

GCK2			
Concentrații: 8% Gelatină/0.28% Nanofibre celuloză/1.6% K-carragenan			
Nr. Crt	Parametrii de printare	Imagini printare	Observații printare
Set 3			
1	Model: linie Diametru acului de printare: 22G Temperatură: 37°C Presiune: 30kPa Viteza de printare: 10mm/s		<i>Extrudarea filamentului este continuă, însă în procesul de printare viteza de 10 mm/s a generat mici întreruperi, precum și o depunere mai puțin controlată, cu forme neregulate ale filamentului, așa cum se observă în imaginea de mai jos.</i>
2	Model: linie Diametru acului de printare: 22G Temperatură: 37°C Presiune: 30kPa Viteza de printare: 8 mm/s		<i>Filamentul obținut a prezentat o extrudare uniformă și continuă, rezultând o structură omogenă, stabilă și fără discontinuități sau variații de grosime.</i>

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

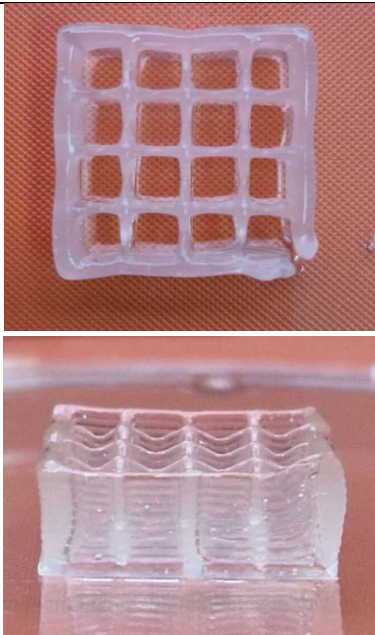
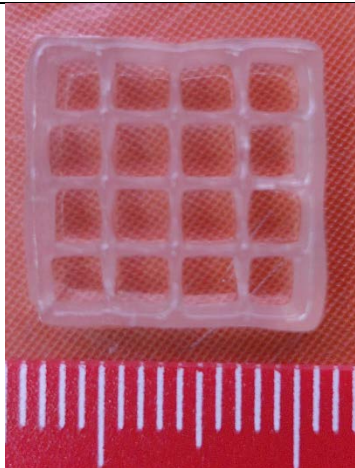
Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

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: 15x15x5 mm Diametru acului de printare: 22G Procentul de umplere: 20% Temperatură: 40°C Presiune: 30kPa Viteza de printare: 8 mm/s		<i>Presiunea și viteza de printare au fost menținute la parametrii anteriori, obținându-se scaffoldul ilustrat în aceste imagini. Se observă că structura are o formă pătrată, asemănătoare modelului CAD, însă ușor neregulată. Pori interiori prezintă, de asemenea, o formă pătrată similară cu modelul CAD, dar cu variații dimensionale. Un alt aspect vizibil este colțul din stânga jos, unde apare o întrerupere a materialului, ceea ce indică faptul că viteza de printare este ușor prea mare pentru presiunea utilizată</i>
4	Dimensiunile selectate: 15x15x5 mm Diametru acului de printare: 22G Procentul de umplere: 20% Temperatură: 37°C Presiune: 30 kPa Viteza de printare: 7 mm/s		Presiunea a fost menținută, iar viteza de printare a fost redusă. Scaffoldul obținut prezintă pori pătrați, cu formă regulată și fără întreruperi de material. Straturile sunt uniforme și continue, ceea ce arată că structura se susține sub propria greutate, indicând că

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

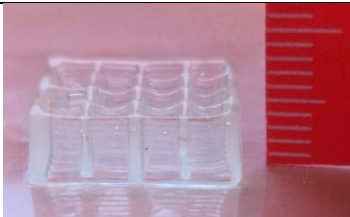
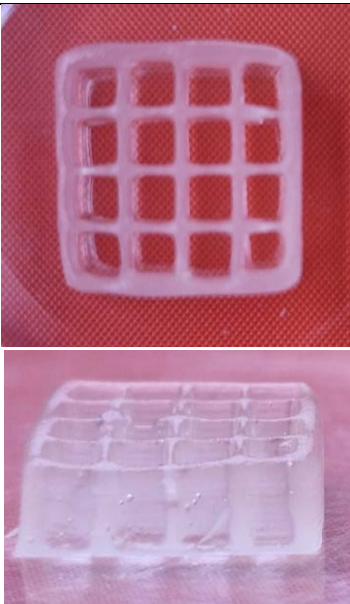
Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

			aceștia reprezintă parametrii optimi pentru această formulare printabilă
5	Dimensiunile selectate: 15x15x5 mm Diametru acului de printare: 22G Procentul de umplere: 20% Temperatură: 37°C Presiune: 30 kPa Viteza de printare: 7 mm/s		<i>Menținerea presiunii și a vitezei de printare au condus la obținerea unor scaffolduri cu pori pătrați, bine conturați și fără întreruperi de material. Straturile depuse au fost uniforme și stabile, demonstrând că structurile se susțin sub propria greutate. Aceste rezultate indică faptul că parametrii selectați pot fi considerați optimi</i>

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

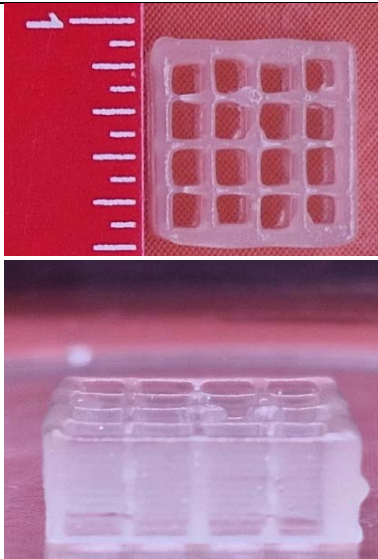
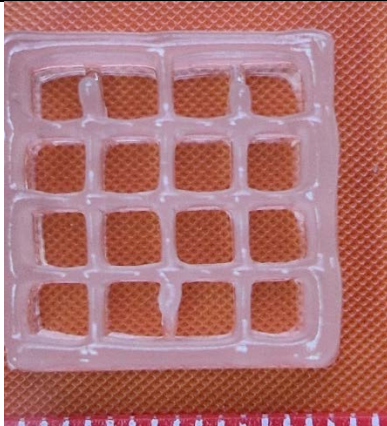
Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

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: 15x15x5 mm Diametru acului de printare: 22G Procentul de umplere: 20% Temperatură: 37°C Presiune: 30 kPa Viteza de printare: 7 mm/s		<i>Menținerea presiunii și a vitezei de printare au condus la obținerea unor scaffolduri cu pori pătrați, bine conturați și fără întreruperi de material. Straturile depuse au fost uniforme și stabile, demonstrând că structurile se susțin sub propria greutate. Aceste rezultate indică faptul că parametrii selectați pot fi considerați optimi pentru printarea acestor formulări.</i>
7	Dimensiunile selectate: 15x15x5 mm Diametru acului de printare: 22G Procentul de umplere: 20% Temperatură: 37°C Presiune: 30 kPa Viteza de printare: 7 mm/s		<i>Menținerea presiunii și a vitezei de printare au condus la obținerea unor scaffolduri cu pori pătrați, bine conturați și fără întreruperi de material. Straturile depuse au fost uniforme și stabile, demonstrând că structurile se susțin sub propria greutate. Aceste rezultate indică faptul că parametrii selectați pot fi considerați optimi pentru printarea acestor formulări.</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

8	Dimensiunile selectate: 15x15x5 mm Diametru acului de printare: 22G Procentul de umplere: 20% Temperatură: 37°C Presiune: 30 kPa Viteza de printare: 7 mm/s		<i>Menținerea presiunii și a vitezei de printare au condus la obținerea unor scaffolduri cu pori pătrați, bine conturați și fără întreruperi de material. Straturile depuse au fost uniforme și stabile, demonstrând că structurile se susțin sub propria greutate. Aceste rezultate indică faptul că parametrii selectați pot fi considerați optimi pentru printarea acestor formulări.</i>
9	Dimensiunile selectate: 15x15x5 mm Diametru acului de printare: 22G Procentul de umplere: 20% Temperatură: 37°C Presiune: 30 kPa Viteza de printare: 7 mm/s		<i>Menținerea presiunii și a vitezei de printare au condus la obținerea unor scaffolduri cu pori pătrați, bine conturați și fără întreruperi de material. Straturile depuse au fost uniforme și stabile, demonstrând că structurile se susțin sub propria greutate. Aceste rezultate indică faptul că parametrii selectați pot fi considerați optimi pentru printarea acestor formulări.</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

10	Dimensiunile selectate: 15x15x5 mm Diametru acului de printare: 22G Procentul de umplere: 20% Temperatură: 37°C Presiune: 30 kPa Viteza de printare: 7 mm/s		<i>Menținerea presiunii și a vitezei de printare au condus la obținerea unor scaffolduri cu pori pătrați, bine conturați și fără întreruperi de material. Straturile depuse au fost uniforme și stabile, demonstrând că structurile se susțin sub propria greutate. Aceste rezultate indică faptul că parametrii selectați pot fi considerați optimi pentru printarea acestor formulări.</i>
11	Dimensiunile selectate: 15x15x5 mm Diametru acului de printare: 22G Procentul de umplere: 20% Temperatură: 37°C Presiune: 30 kPa Viteza de printare: 7 mm/s		<i>După mai multe realizări de scaffolduri soluția din tuburile de printare, a avut o tendință de întărire, ajungându-se la blocarea acului, și la existența unor întreruperi în material.</i>
12	Dimensiunile selectate: 15x15x5 mm Diametru acului de printare: 22G Procentul de umplere: 20% Temperatură: 37°C Presiune: 33 kPa Viteza de printare: 7mm/s		<i>Creșterea presiunii a condus la obținerea unui scaffold cu pori mai încărcați de material și cu o structură a straturilor incapabilă să susțină greutatea celor superioare.</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

			
13	Dimensiunile selectate: 15x15x5 mm Diametru acului de printare: 22G Procentul de umplere: 20% Temperatură: 37°C Presiune: 33 kPa Viteza de printare: 9mm/s		<i>Creșterea vitezei de printare a condus la formarea unui scaffold cu pori drepecți, dar întrerupți, iar straturile obținute, din cauza cantității reduse de material, nu pot susține greutatea straturilor superioare.</i>
14	Dimensiunile selectate: 15x15x5 mm Diametru acului de printare: 22G Procentul de umplere: 20% Temperatură: 37°C Presiune: 33 kPa Viteza de printare: 8mm/s		<i>Presiunea a fost menținută la 33 kPa, însă creșterea vitezei de printare a dus la apariția unor straturi incomplet formate și a întreruperilor de material.</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

15	Dimensiunile selectate: 15x15x5 mm Diametru acului de printare: 22G Procentul de umplere: 20% Temperatură: 37°C Presiune: 33 kPa Viteza de printare: 8mm/s		<i>Presiunea a fost menținută la 33 kPa, însă creșterea vitezei de printare a dus la apariția unor straturi incomplet formate și a întreruperilor de material.</i>
----	---	--	---

Conform tabelului prezentat mai sus, proba 1 (30 kPa, 10 mm/s, 22G, model linie) a arătat că extrudarea filamentului a fost continuă, dar viteza de 10 mm/s a generat mici întreruperi și o depunere mai puțin controlată. Filamentul a prezentat forme neregulate și variații locale de grosime, afectând uniformitatea depunerii. Acest comportament sugerează că viteza selectată este ușor prea mare pentru presiunea aplicată. Proba 2 (30 kPa, 8 mm/s, 22G, model linie) a evidențiat că reducerea vitezei a dus la o extrudare uniformă și continuă. Filamentul a fost stabil și omogen, fără discontinuități sau variații de grosime, ceea ce indică o bună compatibilitate între vâscozitatea soluției și parametrii de lucru. Proba 3 (30 kPa, 8 mm/s, 22G, 10×10×5 mm, 32% umplere, 40°C) a permis obținerea unui scaffold cu formă pătratică asemănătoare modelului CAD, dar ușor neregulată. Pori interiori au avut formă pătratică, însă cu dimensiuni variabile, iar în colțul stânga-jos s-a observat o întrerupere a materialului, ceea ce arată că viteza de 8 mm/s este încă ușor ridicată pentru presiunea utilizată. Proba 4 (30 kPa, 7 mm/s, 22G, 10×10×5 mm, 32% umplere, 37°C) a condus la un scaffold cu pori pătrați, bine conturați și fără întreruperi. Straturile au fost uniforme și continue, iar structura și-a menținut stabilitatea sub propria greutate, confirmând că acești parametri reprezintă condițiile optime pentru această formulare.

Probele 5–10 (30 kPa, 7 mm/s, 22G, 10×10×5 mm, 32% umplere, 37°C) au confirmat reproducibilitatea acestor rezultate, scaffoldurile obținute având constant pori pătrați, bine conturați și straturi uniforme, fără întreruperi. Stabilitatea lor structurală demonstrează că parametrii selectați pot fi considerați optimi. Proba 11 (30 kPa, 7 mm/s, 22G, 10×10×5 mm, 32% umplere, 37°C, după mai multe cicluri de printare) a evidențiat faptul că soluția din tuburile de extrudare a prezentat tendință de întărire, ceea ce a dus la blocarea acului și la apariția unor întreruperi de material. Acest fenomen subliniază limitările practice legate de utilizarea repetată a formulării. Proba 12 (33 kPa, 7 mm/s, 22G, 10×10×5 mm, 32% umplere,

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

37°C) a arătat că prin creșterea presiunii s-au obținut pori supraîncărcați cu material, iar structura nu a mai putut susține greutatea straturilor superioare. Proba 13 (33 kPa, 9 mm/s, 22G, 10×10×5 mm, 32% umplere, 37°C) a demonstrat că, deși porii au părut mai drepecți, aceștia au fost întrerupți. Straturile obținute nu au putut susține straturile superioare, din cauza depunerii insuficiente de material. Probele 14–15 (33 kPa, 8 mm/s, 22G, 10×10×5 mm, 32% umplere, 37°C) au confirmat că menținerea presiunii la 33 kPa și creșterea vitezei de printare la 8 mm/s au generat straturi incomplet formate și întreruperi de material, ceea ce indică instabilitate structurală.

În concluzie, formularea 5,6% Gelatină / 0,26% CNF / 1,5% κ-carragenan a demonstrat o bună printabilitate la parametri 30 kPa, 7 mm/s, 22G, 37°C, conducând la scaffolduri cu pori pătrați, bine conturați și straturi uniforme, stabile sub propria greutate. Totuși, utilizarea repetată a aceleiași soluții a determinat întărirea acesteia și blocarea acului. Creșterea presiunii sau a vitezei de printare a compromis fidelitatea geometrică și stabilitatea structurală. Astfel, parametrii menționați rămân cei mai adecvați pentru această formulare, dar sunt necesare ajustări suplimentare pentru a preveni întărirea în timpul procesului.

Tabelul 4. Optimizarea parametrilor de printare pentru compoziția GCK2.

GCK2			
Concentrații: 8% Gelatină/0.28% Nanofibre celuloză/1.6% K-carragenan			
Nr. Crt	Parametrii de printare	Imagini printare	Observații printare
Set 4			
1	Dimensiunile selectate: 15x15x3 mm Diametru acului de printare: 22G Procentul de umplere: 32% Temperatură: 37°C Presiune: 30kPa Viteza de printare: 7mm/s		<i>Presiunea și viteza de printare au fost menținute identice cu cele utilizate la printările anterioare. Se observă că a fost obținut un scaffold asemănător modelului de referință, cu pori de formă dreaptă și o structură exterioară regulată. De asemenea, se remarcă faptul că materialul nu</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

			<i>colapsează, fiind vizibilă printarea clară a straturilor exterioare.</i>
2	Dimensiunile selectate: 15x15x3 mm Diametru acului de printare: 22G Procentul de umplere: 32% Temperatură: 37°C Presiune: 30kPa Viteza de printare: 7mm/s		<i>Presiunea și viteza de printare au fost menținute ca la structura anterioară. Scaffoldul obținut prezintă pori drepecți și o structură exterioară regulată, fără colapsarea materialului.</i>
3	Dimensiunile selectate: 15x15x5 mm Diametru acului de printare: 22G Procentul de umplere: 32% Temperatură: 37°C Presiune: 30kPa Viteza de printare: 7mm/s		<i>Presiunea și viteza de printare au fost menținute ca la structura anterioară. Scaffoldul obținut prezintă pori drepecți și o structură exterioară regulată, fără colapsarea materialului.</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: 15x15x5 mm Diametru acului de printare: 22G Procentul de umplere: 32% Temperatură: 37°C Presiune: 30kPa Viteza de printare: 7mm/s		<i>Presiunea și viteza de printare au fost menținute ca la structura anterioară. Scaffoldul obținut prezintă pori drepecți și o structură exterioară regulată, fără colapsarea materialului.</i>
5	Dimensiunile selectate: 15x15x5 mm Diametru acului de printare: 22G Procentul de umplere: 32% Temperatură: 37°C Presiune: 30kPa Viteza de printare: 7mm/s		<i>Presiunea și viteza de printare au fost menținute ca la structura anterioară. Scaffoldul obținut prezintă pori drepecți și o structură exterioară regulată, fără colapsarea materialului.</i>

Utilizând cei mai buni parametri și compoziția formulării anterioare din Tabelul 4, s-a realizat o nouă serie de experimente de printare. Astfel, pentru proba 1, presiunea și viteza de printare au fost menținute identice cu cele utilizate în printările anterioare. Se observă că a fost obținut un scaffold asemănător modelului de referință, prezentând pori de formă dreaptă și o structură exterioară regulată. De asemenea, se remarcă faptul că materialul nu a colapsat, fiind

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

vizibilă o depunere clară și continuă a straturilor exterioare, ceea ce confirmă stabilitatea parametrilor selectați. În cazul Probei 2, presiunea și viteza de printare au fost menținute la aceleași valori ca la structura anterioară. Scaffoldul obținut prezintă pori bine definiți, cu o formă dreaptă și o structură exterioară regulată.

Se evidențiază, de asemenea, faptul că materialul nu colapsează, ceea ce demonstrează o bună reproducibilitate a rezultatelor față de Proba 1. Proba 3 a fost realizată cu aceiași parametri de presiune și viteză de printare ca și structurile anterioare. Scaffoldul rezultat prezintă pori drepecți și o structură exterioară regulată, fără colapsarea materialului. Dimensiunile mai mari ale probei nu au afectat stabilitatea structurală, iar straturile s-au păstrat uniforme pe întreaga înălțime a construcției. În Proba 4, parametrii de lucru au fost menținuți la aceleași valori ca la printările precedente. Scaffoldul obținut prezintă pori drepecți și uniformi, precum și o structură exterioară regulată, stabilă și bine conturată. Materialul nu a prezentat colaps, iar depunerea straturilor a fost uniformă și clară, confirmând consistența rezultatelor obținute. Pentru Proba 5, parametrii de printare au fost menținuți similari cu cei utilizați anterior, adaptându-se la noile condiții experimentale. Scaffoldul obținut prezintă pori de formă dreaptă și o structură exterioară regulată, fără colapsarea materialului. Chiar și la o temperatură mai ridicată și la o presiune crescută, structura s-a menținut stabilă, iar depunerea filamentului a fost clară și uniformă, ceea ce confirmă o bună comportare a formulării în aceste condiții.

Analiza rezultatelor obținute în urma seriei de printări realizate, utilizând compoziția formulării prezentate în Tabelul 4 și parametrii optimi de proces, evidențiază faptul că această combinație reprezintă condițiile ideale pentru fabricarea scaffold-urilor 3D stabile și reproducibile. Toate probele evaluate (1–5) au prezentat pori bine definiți, de formă dreaptă, precum și o structură exterioară regulată și uniformă, fără semne de colaps al materialului, ceea ce confirmă stabilitatea parametrilor selectați. De asemenea, reproducerea fidelă a modelului de referință și menținerea uniformității depunerii straturilor, chiar și în cazul variațiilor dimensiunilor probelor sau al modificărilor de temperatură și presiune, demonstrează consistența și fiabilitatea procesului de printare. Aceste rezultate sugerează că formularea și condițiile de printare adoptate sunt adecvate pentru realizarea scaffold-urilor 3D cu proprietăți structurale și geometrice optime.

I.1.3.4. Concluzii

Analiza sistematică a rezultatelor obținute în urma testării diferitelor formulări de hidrogel și a parametrilor de printare evidențiază o relație clară între vâscozitatea materialului, presiunea de extrudare, viteza de depunere și fidelitatea geometrică a scaffoldurilor 3D. Formularea inițială (GCK 1), compusă din 4,3% gelatină, 0,2% nanofibre de celuloză și 1,15%

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

κ -carragenan, a prezentat limitări semnificative privind stabilitatea structurală a scaffoldurilor. Filamentul obținut în timpul extrudării nu a fost uniform, iar vâscozitatea relativ scăzută a dus la acumularea excesivă de material la capătul filamentului. În probele cu presiune și viteză standard (22G, 37°C, 30 kPa, 10 mm/s), s-au observat pori ovalizați, structuri exterioare neregulate și tendințe de colaps ale straturilor, indicând faptul că această formulare nu poate susține fidelitatea geometrică necesară.

Ajustările parametrilor de printare, inclusiv scăderea presiunii și creșterea vitezei, au adus unele îmbunătățiri, dar porii scaffoldurilor au rămas incomplet definiți, iar unele regiuni au prezentat întreruperi ale filamentului. Astfel, se poate concluziona că vâscozitatea insuficientă a hidrogelului reprezintă un factor limitativ major pentru printarea cu succes a scaffoldurilor stabile. Această etapă a permis identificarea nevoii de optimizare a concentrației componentelor, conducând la formularea GCK 2 optimizată: 8% gelatină, 0,28% nanofibre celuloză (CNF) și 1,6% κ -carragenan.

Testele efectuate cu această formulare optimizată au demonstrat o îmbunătățire semnificativă a comportamentului materialului la extrudare. Filamentul a prezentat continuitate și uniformitate, fără discontinuități sau variații semnificative de grosime, ceea ce confirmă compatibilitatea reologică a hidrogelului cu parametrii de lucru. S-a observat că presiunea și viteza de printare influențează direct fidelitatea geometrică a scaffoldurilor: presiuni prea mari generează suprapunere și colaps al straturilor, în timp ce presiuni prea mici duc la întreruperi ale filamentului și pori incomplet conturați.

Seria de probe indică faptul că parametrii optimi pentru printarea formulării GCK 2 sunt 30 kPa pentru presiune și 7-8 mm/s pentru viteza de depunere, utilizând ac de 22G și menținând temperatura de lucru la 37°C. În aceste condiții, scaffoldurile obținute au prezentat pori pătrați, bine conturați, straturi uniforme și o stabilitate structurală excelentă, reproducând cu fidelitate modelul CAD de referință. Testele suplimentare au confirmat reproducibilitatea acestor rezultate pe mai multe probe și dimensiuni, demonstrând robustetea și consistența procesului de printare.

Totuși, s-a observat că utilizarea repetată a aceleiași soluții conduce la întărirea acesteia în tuburile de extrudare, fenomen care poate genera blocarea acului și întreruperi ale filamentului. De asemenea, creșterea excesivă a presiunii sau a vitezei de printare compromite stabilitatea straturilor și fidelitatea geometrică, ceea ce subliniază necesitatea menținerii parametrilor optimi. Prin urmare, pentru printarea scaffoldurilor 3D stabile și precise, concentrația formulării de 8% gelatină, 0,28% CNF și 1,6% κ -carragenan, combinată cu parametrii de lucru 30 kPa și 7-8 mm/s, reprezintă condiția optimă. Acești parametri permit

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE
POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

obținerea unor scaffolduri cu proprietăți structurale și geometrice superioare, straturi uniforme și pori bine definiți, asigurând reproducibilitatea și fiabilitatea procesului de printare.

În concluzie, optimizarea atât a concentrației componentelor hidrogelului, cât și a parametrilor de extrudare a fost esențială pentru realizarea scaffoldurilor 3D stabile și fideli modelului CAD. Formularea GCK 2 și parametrii selectați oferă un echilibru adecvat între vâscozitate, flux de material și stabilitate structurală, constituind astfel baza pentru dezvoltarea de scaffolduri funcționale în aplicații biomedicale și inginerie tisulară. Această combinație poate fi considerată formularea și condiția de lucru recomandată pentru viitoare experimente de printare 3D cu aceste tipuri de hidrogeluri.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

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

II.1. CAPITOL 1

II.1.1. Pregătirea culturii celulare și evaluarea biocompatibilității structurilor din gelatină, gellan, CNF-uri și diferiți derivați grafenici, prin testare Live/Dead

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

Subactivitatea 1.4. Printarea 3D cu formulări printabile 4D și formulări printabile 4D cu celule.

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

II.1.1.1. Introducere

Menținerea culturilor celulare în condiții controlate reprezintă un aspect fundamental în cercetarea biomedicală, în special în contextul evaluării viabilității celulare diferitelor biomateriale [1]. Testele de viabilitate celulară constituie instrumente esențiale pentru aprecierea capacității unui biomaterial de a susține aderarea, proliferarea și funcționalitatea celulelor, oferind astfel informații privind biocompatibilitatea acestuia. Pentru ca aceste evaluări să fie valide și reproductibile, culturile celulare trebuie menținute într-un mediu care să reproducă fidel condițiile fiziologice, inclusiv parametri chimici, oxigenarea și disponibilitatea nutrienților [2], [3]. Parametri precum pH-ul, concentrația de oxigen, compoziția mediului și absența contaminanților microbieni influențează direct comportamentul celular, iar orice abatere poate conduce la rezultate experimentale inexacte. Prin urmare, implementarea unor protocoale riguroase de manipulare aseptică, monitorizare continuă și optimizare a condițiilor de cultură este indispensabilă pentru obținerea datelor experimentale [4], [5].

Evaluarea biocompatibilității biomaterialelor prin testare Live/Dead constituie o metodă standard pentru investigarea celulelor viabile și moarte în culturile expuse la materiale experimentale [6]. Această abordare se bazează pe utilizarea unor coloranți fluorescenți complementari, care permit discriminarea rapidă și precisă între celulele viabile, cu membrane intacte, și celulele compromise sau moarte, ale căror membrane sunt permeabile. Această dublă marcare permite nu doar cuantificarea rapidă a procentului de celule viabile și moarte, ci și analiza distribuției spațiale a acestora pe suprafața biomaterialului, oferind informații asupra uniformității și compatibilității materialului cu celulele [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 acest context, s-au realizat evaluări ale biocompatibilității prin marcarea Live/Dead la 1, 4, 7 și 14 zile a probelor printate 3D pe bază de gelatină, gellan, nanofibre de celuloză (CNFs) și doi derivați grafenici, oxid de grafenă carboxilat (GC-CBX) și oxid redus de grafenă aminat (GC-AMN). Probele fără derivați grafenici au fost codificate GC, iar cele conținând ambii derivați GC-CBX/AMN.

II.1.1.2. Matertiale și metode

II.1.1.2.1. Materiale

Liniile celulare osteoblaste umane MG-63 (CLS Cell Lines Service GmbH, Heidelberg, Germania) au fost utilizate pentru toate experimentele. 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 de Penicilină-Streptomicină 100× (Gibco™, Thermo Fisher Scientific). Kitul comercial Live/Dead Viability/Cytotoxicity Kit, for mammalian cells a fost 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)

II.1.1.2.2. Dezghețarea liniei celulare MG63

Liniile celulare osteoblaste MG-63 dezghețate și cultivate într-un mediu DMEM, suplimentat cu 10% FBS și 1% soluție de Penicilină-Streptomicină, în condiții standard de temperatură și umiditate, respectiv la 37°C, 5% CO₂ și 90% umiditate relativă. Culturile celulare au fost pregătite conform protocolului standard de reactivare a crioculturilor. Inițial, criotubul a fost lăsat să se dezghețe într-o baie cu bile metalice la 37°C, după care conținutul a fost transferat în hotă pentru manipulare aseptică. Suspensia celulară a fost omogenizată prin pipetare ușoară pentru a asigura uniformitatea celulelor.

Ulterior, întreaga suspensie (1.5 ml) a fost transferat într-un tub de centrifugare de 15 ml, care conținea 8 ml de mediu de cultură complet, eliberând suspensia celulară încet, de jos în sus, pentru a preveni aglomerarea celulelor. Tuburile au fost centrifugate la 300 rpm timp de 6 minute pentru sedimentarea celulelor. După centrifugare, supernatantul a fost îndepărtat, iar celulele au fost resuspendate în 1 ml de mediu complet.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

Pentru inițierea culturilor, mediu complet a fost adăugat în trei flask-uri de 75 cm², iar suspensia celulară a fost distribuită uniform, câte 0,33 ml per flask. Flask-urile au fost ulterior incubate în condiții standard, permițând aderarea și proliferarea celulelor înainte de utilizarea acestora în experimente ulterioare. Mediul de cultură a fost schimbat la 2-3 zile pentru a asigura nutrienții și pH-ul optim culturii celulare. Înainte de schimbarea mediului, atât mediul de cultură, cât și soluția PBS au fost încălzite la temperatura camerei sau la 37°C pentru a evita stresul termic asupra celulelor. Mediu utilizat anterior a fost eliminat din flask-uri, iar acestea au fost spălate ușor cu 5 ml PBS pentru a îndepărta celulele moarte și reziduurile metabolice. Ulterior, s-au adăugat 10 ml de mediu complet proaspăt în fiecare flask, asigurând distribuirea uniformă a nutrienților. Flask-urile au fost apoi plasate în incubator, menținând condițiile standard de cultură pentru continuarea proliferării și supraviețuirii celulelor.

II.1.1.2.3.Pasajul celular

Pentru proliferarea optimă a culturilor, a fost efectuat pasajul celular, procedura esențială pentru prevenirea confluenței excesive și menținerea viabilității celulare. Înainte de manipulare, mediul de cultură, soluția PBS și Tripsina (TripLE) au fost încălzite la 37°C pentru a minimiza stresul termic asupra celulelor. Mediu utilizat anterior a fost eliminat din flask-uri, care au fost spălate de două ori cu câte 5 ml PBS pentru a îndepărta celulele moarte și reziduurile metabolice. Ulterior, s-au adăugat 2 ml TripLE în fiecare flask, iar celulele au fost incubate timp de 2–3 minute pentru a favoriza detașarea acestora de suprafața flask-ului. După aceasta, s-au adăugat 6 ml de mediu complet, iar suspensia celulară a fost omogenizată ușor. Conținutul celor patru flask-uri a fost transferat în tuburi de centrifugare de 15 ml și centrifugat la 1350 rpm timp de 3 minute pentru sedimentarea celulelor. Supernatantul a fost îndepărtat, iar celulele au fost resuspendate în 1 ml de mediu complet.

Suspensia omogenizată a fost distribuită în flask-uri noi cu mediu complet și incubată în condiții standard pentru continuarea proliferării. În plus, schimbarea mediului s-a realizat după 2-3 zile pentru a asigura condiții optime de viabilitate și funcționalitate celulară. Această procedură a permis atât menținerea culturilor sănătoase, cât și pregătirea acestora pentru teste experimentale ulterioare.

II.1.1.2.4. Însămânțarea celulelor și pregătirea probelor

Pentru efectuarea testelor de interacțiune între celule și biomaterial, s-au selectat câte opt probe din fiecare tip de structură, care au fost dispuse în plăci cu 12 godeuri. În fiecare

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

placă s-a lăsat spațiu pentru controlul negativ. Probele au fost introduse în hota cu flux laminar vertical și au fost supuse sterilizării UV timp de 1 oră pe fiecare suprafață pentru a elimina potențialele contaminări microbiene.

Celulele au fost pregătite prin detașare cu TripLE. Astfel, mediul din cele trei flask-uri a fost îndepărtat, iar suprafețele au fost spălate de două ori cu 5 ml PBS. Ulterior, s-au adăugat 2 ml TripLE, iar celulele au fost incubate 2–3 minute pentru a facilita detașarea de suprafață. Celulele au fost resuspendate în 6 ml mediu complet și omogenizate ușor, după care conținutul flask-urilor a fost transferat într-un tub de 50 ml, centrifugat la 1350 rpm timp de 3 minute, iar supernatantul a fost eliminat. Celulele au fost resuspendate în 1 ml mediu complet, iar pentru determinarea densității celulare s-a efectuat colorarea cu albastru tripan. Suspensia a fost diluată pentru a obține densitatea dorită, iar din aceasta s-au însămânțat în plăci 100 000 celule/godeu. Plăcile au fost incubate timp de 30 de minute pentru aderarea celulelor, după care s-au adăugat 2 ml mediu complet. Probele sterilizate UV au fost apoi transferate în plăcile însămânțate, iar întregul ansamblu a fost incubat în condiții standard, asigurând contactul optim între celule și biomaterial pentru evaluarea viabilității la 1, 4, 7 și 14 zile.

II.1.1.2.5. Evaluarea viabilității celulare prin marcare Live/Dead la 1, 4, 7 și 14 zile

Pentru evaluarea viabilității celulare pe biomateriale, s-a utilizat testul Live/Dead, bazat pe coloranți fluorescenți care permit discriminarea celulelor viabile de cele moarte. Inițial, PBS-ul a fost încălzit la 37 °C, iar componentele kit-ului, inclusiv calcein am și ethidium homodimer, au fost lăsate la temperatura camerei pentru a evita șocul termic. procedura s-a desfășurat în întuneric, pentru a preveni fotodegradarea coloranților.

Soluția de lucru a fost pregătită într-un tub de 15 ml prin adăugarea a 10 ml PBS, 5 μl Calcein AM și 20 μl Ethidium homodimer. Plăcile cu celule, aflate anterior în incubator, au fost scoase, mediul din godeuri a fost îndepărtat, iar acestea au fost spălate de două ori cu câte 1 ml PBS pentru eliminarea reziduurilor. Ulterior, fiecărui godeu i s-a adăugat 1 ml soluție Live/Dead, iar plăcile au fost acoperite cu folie de aluminiu și incubate timp de 40 de minute în întuneric, asigurând colorarea uniformă a celulelor.

După incubare, soluția a fost îndepărtată, iar în godeuri s-a adăugat 1 ml PBS pentru vizualizare. Celulele au fost examinate la microscopul cu fluorescență (DMIL LED Fluo model with DFC450-C capture system, Leica, Germany) utilizând lungimile de undă corespunzătoare. Această metodă permite evaluarea vizuală a viabilității celulare și, implicit, a biocompatibilității biomaterialelor testate.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

II.1.1.3. Rezultate și discuții

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

Dezghețarea și cultivarea liniilor celulare osteoblaste MG-63 s-au realizat cu succes, celulele prezentând morfologia caracteristică acestei linii celulare. După transferul în mediu complet DMEM, suplimentat cu 10% FBS și 1% soluție de Penicilină-Streptomicină, celulele au aderat corespunzător la suprafața flask-urilor și au început să prolifereze în condițiile standard de cultură (37°C, 5% CO₂, 90% umiditate relativă). În primele zile de cultură, celulele au prezentat o morfologie tipică osteoblastelor de tip MG-63, respectiv o formă alungită, fibroblastoidă, cu nucleu central bine delimitat și o distribuție uniformă pe suprafața de cultură (Figura 1).

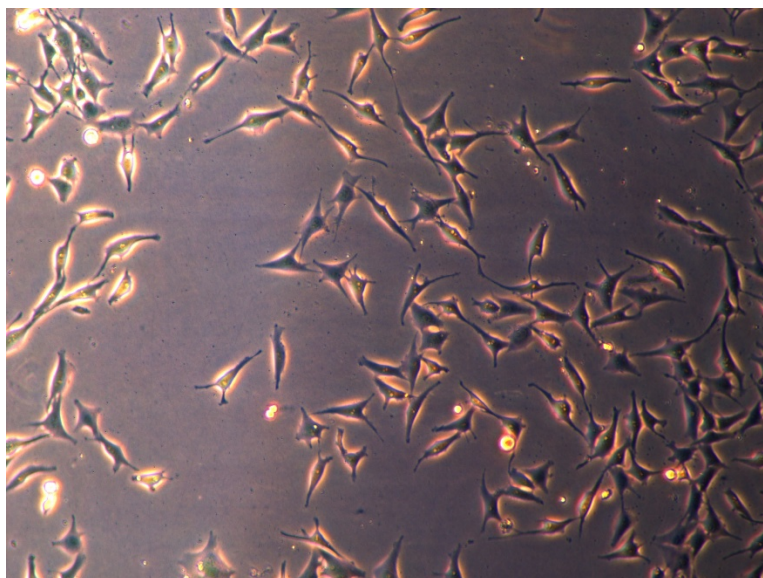


Figura 1. Celulele MG63 aderate după pasajul celular

Pe parcursul menținerii culturilor, schimbarea mediului de cultură la intervale regulate de 2–3 zile a asigurat un aport constant de nutrienți și menținerea unui pH optim, ceea ce a permis proliferarea susținută a celulelor. Numărarea celulelor s-a realizat cu ajutorul camerei de numărare și a microscopului inversat DMIL LED Fluo model with DFC450 (Figura 2).

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

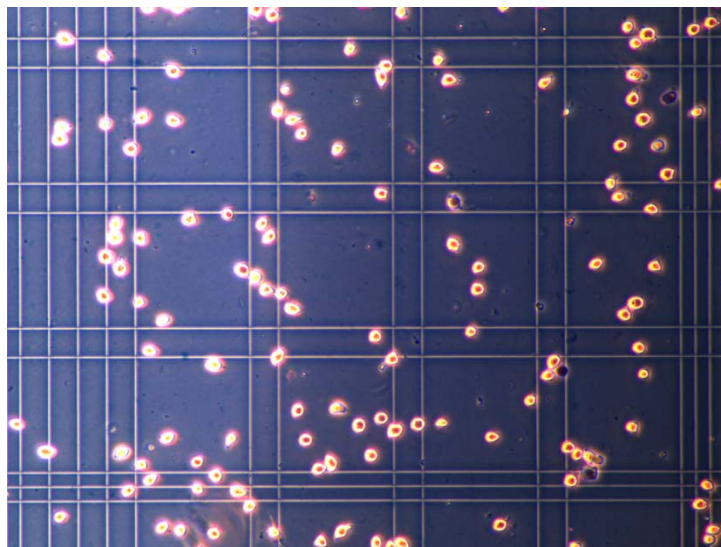


Figura 2. Numărarea celulelor cu ajutorul microscopului inversat DMIL LED Fluo model with DFC450

Etapa de însămânțare a celulelor MG-63 în plăcile cu godeuri a fost realizată cu succes, respectând condițiile de sterilitate și densitatea celulară dorită (Figura 3). Probele au fost sterilizate prin expunere la radiații UV timp de 1 oră pe fiecare suprafață, fapt care a asigurat eliminarea potențialelor contaminări.



Figura 3. Plăcile cu godeuri conținând celulele MG63 și probele de evaluat la 4, 7 și 14 zile (de la stânga la dreapta)

Celulele au prezentat o morfologie caracteristică, cu o distribuție uniformă pe suprafața godeurilor (Figura 4). Condițiile standard de incubare (37°C, 5% CO₂, 90% umiditate relativă) au permis menținerea viabilității și proliferării celulare pe întreaga durată a experimentului, probele fiind pregătite pentru evaluarea la intervalele stabilite de 1, 4, 7 și 14 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

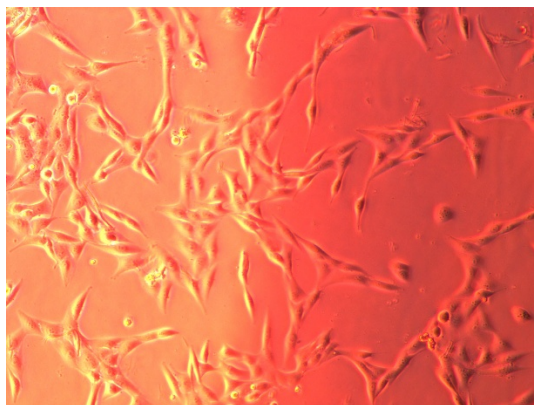


Figura 4. Celulele MG63 la o zi după însămânțarea în plăci cu godeuri pentru evaluarea viabilității celulare prin Live/Dead

Analiza viabilității celulelor MG-63 cultivate pe probele printate 3D a evidențiat o bună capacitate de adaptare și proliferare, confirmând compatibilitatea dintre biomateriale și linia celulară utilizată. La 1 zi de cultură (Figura 5), celulele au prezentat o viabilitate ridicată, însă densitatea lor era redusă, majoritatea aflându-se într-un stadiu incipient de aderare. Morfologia observată a fost predominant rotunjită, specifică celulelor aflate în proces de fixare pe substrat. Numărul celulelor neviabile (colorate în roșu) a fost redus, ceea ce sugerează că procesul de însămânțare și transfer pe probe nu a indus un stres major asupra culturilor.

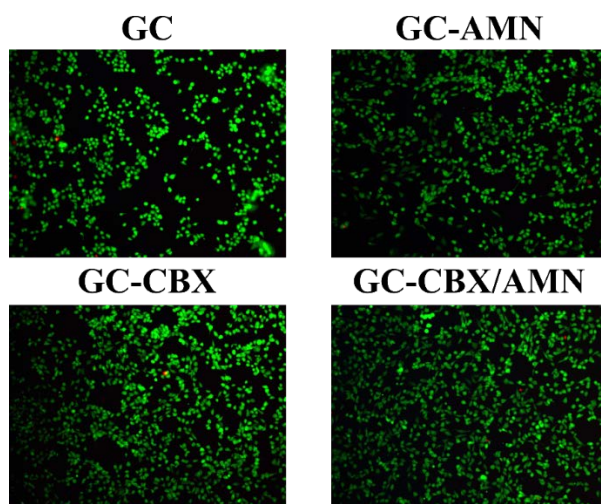


Figura 5. Imagini ale celulelor aflate în contact cu probele după o zi, marcate fluorescent live/dead

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

După 4 zile (Figura 6), s-a observat o creștere a numărului de celule viabile (colorate în verde), acestea prezentând o morfologie specifică, alungită și bine aderentă pe suprafața scaffoldurilor. Distribuția celulelor a fost uniformă, ceea ce confirmă că structurile nu au interferat cu mecanismul normal de atașare al celulelor MG-63. Rezultatele sugerează că biomaterialele oferă un mediu adecvat pentru fixarea inițială și începerea procesului de proliferare.

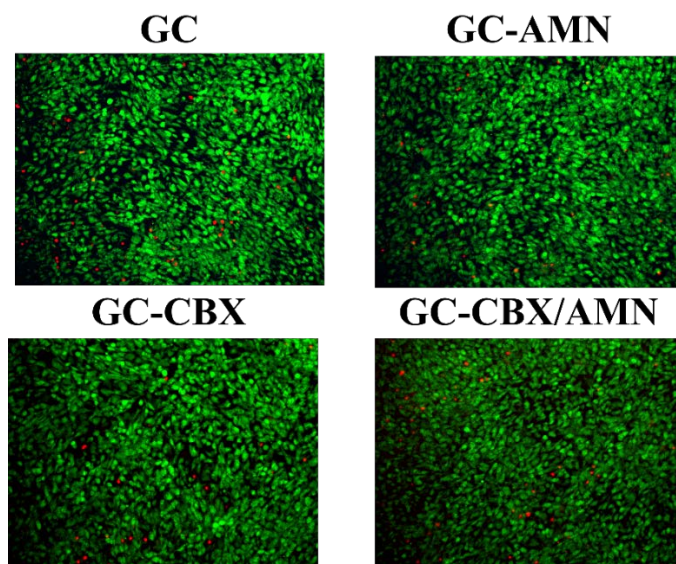


Figura 6. Imagini ale celulelor aflate în contact cu probele după 4 zile, marcate fluorescent live/dead

La 7 zile de cultură, imaginile au evidențiat o creștere semnificativă a densității celulare, celulele fiind bine răspândite (Figura 7). Morfologia caracteristică a fost menținută, iar celulele au format rețele interconectate, ceea ce indică atât proliferarea activă, cât și stabilirea unor interacțiuni celulă-celulă. Numărul celulelor neviabile a rămas redus, confirmând toleranța bună a celulelor la structurile printate 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

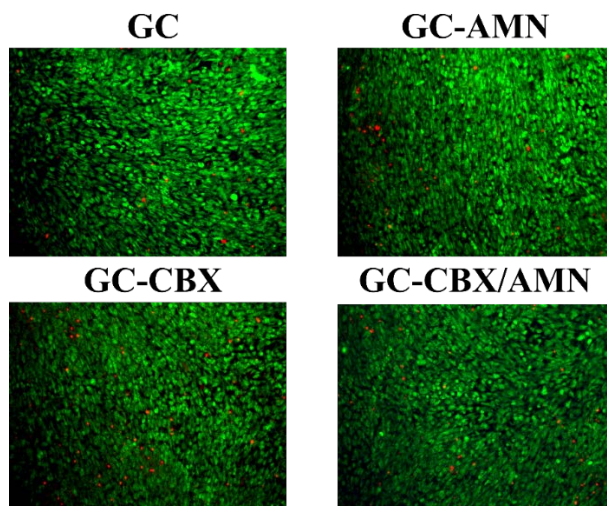


Figura 7. Imagini ale celulelor aflate în contact cu probele după 7 zile, marcate fluorescent live/dead

Ultima evaluarea, la 14 zile, a demonstrat biocompatibilitatea probelor pentru perioade extinse de timp (Figura 8). Culturile au prezentat o densitate celulară ridicată, cu zone extinse acoperite aproape complet de celule viabile. Celulele MG-63 și-au menținut morfologia, aliniindu-se de-a lungul suprafeței și indicând o bună adaptare. Numărul celulelor neviabile a fost redus și nu a afectat integritatea generală a culturilor.

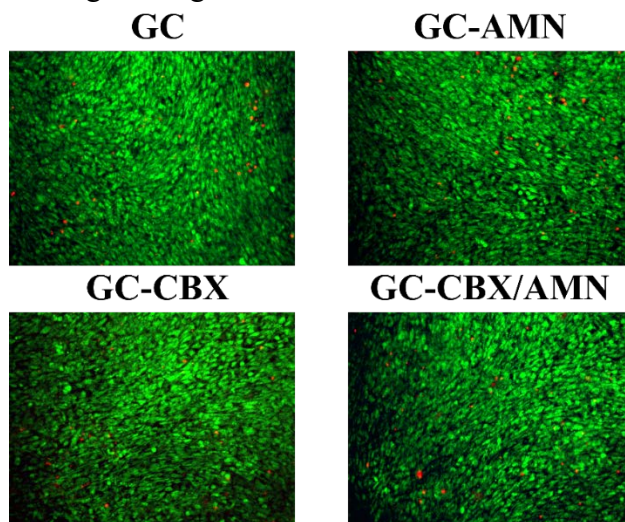


Figura 8. Imagini ale celulelor aflate în contact cu probele după 14 zile, marcate fluorescent live/dead

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

II.1.1.4. Concluzii

Studiul a demonstrat că dezghețarea, cultivarea, pasajul și însămânțarea celulelor osteoblastice MG-63 s-au realizat cu succes, menținând morfologia și viabilitatea caracteristice acestei linii celulare. Protocolul utilizat a asigurat condiții optime de creștere, iar mediul complet suplimentat cu ser fetal bovin și antibiotic a permis proliferarea susținută a celulelor fără contaminări. Schimbarea regulată a mediului, împreună cu spălările succesive cu PBS, a contribuit la menținerea unui microambient favorabil și la prevenirea acumulării factorilor de stres celular. Etapa de însămânțare a fost realizată în condiții de sterilitate, probele fiind pregătite corespunzător prin expunere la radiații UV. Celulele au fost distribuite uniform și au prezentat o viabilitate ridicată încă din prima zi, adaptându-se progresiv la contactul cu probele printate 3D. Evaluarea la intervale succesive a evidențiat un proces continuu de proliferare, confirmând compatibilitatea dintre biomateriale și celulele MG63.

Astfel, la 1 zi după însămânțare, celulele prezentau o morfologie predominant rotunjită, specifică fazei incipiente de atașare, cu un număr redus de celule neviabile. La 4 zile, celulele au dobândit morfologia alungită și atașată, caracteristică liniei MG63, fiind distribuite uniform pe suprafața scaffoldurilor. După 7 zile, densitatea celulară a crescut semnificativ, celulele formând rețele interconectate și menținând o viabilitate ridicată, în timp ce la 14 zile s-a observat o acoperire extinsă a probelor, cu zone aproape complet populate de celule viabile și cu un număr minim de celule moarte. Aceste rezultate confirmă biocompatibilitatea ridicată a scaffoldurilor testate. În concluzie, probele printate 3D investigate prezintă un potențial semnificativ în ingineria tisulară osoasă, întrucât permit o bună viabilitate, aderență și proliferare a celulelor MG63 pe perioade extinse de timp.

Bibliografie

- [1] “Standard Cell Culture Techniques,” *Introduction to Cell and Tissue Culture*, pp. 63–87, Aug. 1998, doi: 10.1007/978-0-585-27571-0_5.
- [2] B. Subramani, P. M. Chaudhary, and R. Kikkeri, “A Cell-Culture Technique to Encode Glyco-Nanoparticles Selectivity,” *Chem Asian J*, vol. 16, no. 23, pp. 3900–3904, Dec. 2021, doi: 10.1002/ASIA.202101015.
- [3] C. Wertheimer *et al.*, “A cell culture technique for human epiretinal membranes to describe cell behavior and membrane contraction in vitro,” *Graefe’s Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, vol. 255, no. 11, pp. 2147–2155, Nov. 2017, doi: 10.1007/S00417-017-3767-X/FIGURES/6.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE
POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

[4] S. M. Badr-Eldin, H. M. Aldawsari, S. Kotta, P. K. Deb, and K. N. Venugopala, “Three-Dimensional In Vitro Cell Culture Models for Efficient Drug Discovery: Progress So Far and Future Prospects,” *Pharmaceuticals* 2022, Vol. 15, Page 926, vol. 15, no. 8, p. 926, Jul. 2022, doi: 10.3390/PH15080926.

[5] W. Zhang, A. Zhuang, P. Gu, H. Zhou, and X. Fan, “A Review of the Three-Dimensional Cell Culture Technique: Approaches, Advantages and Applications,” *Curr Stem Cell Res Ther*, vol. 11, no. 4, pp. 370–380, Feb. 2016, doi: 10.2174/1574888X11666160217154007.

[6] P. Spaepen, S. De Boodt, J. M. Aerts, and J. Vander Sloten, “Digital Image Processing of Live/Dead Staining,” *Methods in Molecular Biology*, vol. 740, pp. 209–230, 2011, doi: 10.1007/978-1-61779-108-6_21.

[7] G. Borciani, G. Montalbano, N. Baldini, C. Vitale-Brovarone, and G. Ciapetti, “Protocol of Co-Culture of Human Osteoblasts and Osteoclasts to Test Biomaterials for Bone Tissue Engineering,” *Methods and Protocols* 2022, Vol. 5, Page 8, vol. 5, no. 1, p. 8, Jan. 2022, doi: 10.3390/MPS5010008.

[8] 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

PARTEA III

III.1. CAPITOL 1

III.1.1. Crioprezervarea culturii celulare MG63

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

Subactivitatea 1.4. Printarea 3D cu formulări printabile 4D și formulări printabile 4D cu celule..

III.1.1.1. Introducere

Crioprezervarea culturilor celulare reprezintă o etapă esențială în cercetarea biomedicală și biotehnologică, fiind metoda standard prin care celulele sunt conservate pe termen lung fără pierderea viabilității și a proprietăților lor biologice. Menținerea liniilor celulare în condiții convenționale de cultură implică riscuri majore, precum acumularea de mutații spontane, deriva genetică, contaminarea bacteriană sau micotică și modificările fenotipice asociate cu trecerile repetate. Aceste fenomene pot compromite reproducibilitatea și relevanța rezultatelor experimentale [1], [2].

Prin crioprezervare, celulele sunt stocate în condiții de temperatură extrem de scăzută, într-o stare de metabolism suspendat, ceea ce permite stoparea proceselor biologice și menținerea stabilității genetice și funcționale pentru perioade îndelungate. Utilizarea agenților crioprotectori (ex: dimetilsulfoxid-DMSO) și a protocoalelor controlate de răcire previne formarea cristalelor de gheață intracelulare, reducând daunele mecanice și stresul osmotic [3], [4].

III.1.1.2. Matertiale și metode

III.1.1.2.1. Materiale

Cultura celulară înghețată a fost MG-63 (CLS Cell Lines Service GmbH, Heidelberg, Germania). S-a utilizat mediul de cultură Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SUA), suplimentat cu ser fetal bovin (FBS; Gibco™, Thermo Fisher Scientific) și soluție de Penicilină-Streptomicină 100× (P-S, Gibco™, Thermo Fisher Scientific). DMOS-ul și tripsina au fost furnizate de Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, SUA), iar soluția de tampon fosfat salin (PBS) a fost furnizată de Sigma Aldrich Merck (Darmstadt, Germany).

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

III.1.1.2.2. Crioprezervarea culturii celulare MG63

Pentru crioprezervarea liniei celulare MG63, s-a stabilit în prealabil numărul de criotuburi necesare, fiecare fiind etichetat corespunzător cu numele liniei celulare, data și numărul pasajului. DMSO utilizat ca agent crioprotector a fost filtrat steril și ulterior incorporat într-un mediu de congelare, preparat prin suplimentarea DMEM cu 10% DMSO, 15% FBS și 1% P-S. Astfel, pentru un volum final de 25 ml, compoziția a inclus: 18,75 ml DMEM, 3,75 ml FBS, 2,5 ml DMSO și 0,25 ml P-S.

Culturile celulare osteoblaste MG-63 au fost pregătite prin îndepărtarea mediului de cultură din flask-uri și spălarea succesivă de două ori cu 5 ml PBS. Pentru detașare, s-au adăugat 2 ml tripsină, urmate de incubare până la desprinderea completă a celulelor. Reacția a fost neutralizată prin adăugarea a 4 ml de mediu complet (37°C), iar suspensia celulară obținută a fost colectată și centrifugată la 1350 rpm timp de 3 minute. După centrifugare, supernatantul a fost îndepărtat, iar sedimentul celular a fost resuspendat în mediu de congelare, câte 1,5 ml pentru fiecare criotub (16 criotuburi, echivalent cu 24 ml).

Fiecare criotub a fost sterilizat cu etanol 70% și depozitat în poziție verticală într-o cutie de congelare. Toate criotuburile au fost transferate într-un congelator la -80°C.

III.1.1.3. Concluzii

Respectarea strictă a etapelor din protocolul de crioprezervare este esențială pentru menținerea viabilității și a stabilității funcționale a culturilor celulare pe termen lung. Fiecare pas, de la prepararea corectă a mediului cu agenți crioprotectori și spălarea celulelor pentru eliminarea reziduurilor, până la centrifugarea controlată, resuspendarea în mediu adecvat și etichetarea riguroasă a criotuburilor, contribuie la prevenirea contaminării, la reducerea stresului osmotic și la evitarea formării cristalelor de gheață intracelulare. Astfel, protocolul asigură conservarea caracteristicilor genetice și fenotipice ale celulelor, precum și disponibilitatea acestora pentru experimente ulterioare reproductibile și comparabile. Prin urmare, crioprezervarea nu reprezintă doar o tehnică de depozitare, ci o condiție indispensabilă pentru garantarea calității și integrității materialului biologic utilizat în cercetarea biomedicală și aplicațiile biotehnologice.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

Bibliografie

- [1] H. T. Meryman, “Cryopreservation of living cells: principles and practice,” *Transfusion (Paris)*, vol. 47, no. 5, pp. 935–945, May 2007, doi: 10.1111/J.1537-2995.2007.01212.X.
- [2] A. N. Jaiswal and A. Vagga, “Cryopreservation: A Review Article”, doi: 10.7759/cureus.31564.
- [3] K. A. Murray and M. I. Gibson, “Chemical approaches to cryopreservation,” *Nat Rev Chem*, vol. 6, no. 8, pp. 579–593, Aug. 2022, doi: 10.1038/S41570-022-00407-4;SUBJMETA.
- [4] D. Whaley, K. Damyar, R. P. Witek, A. Mendoza, M. Alexander, and J. R. T. Lakey, “Cryopreservation: An Overview of Principles and Cell-Specific Considerations,” *Cell Transplant*, vol. 30, 2021, doi: 10.1177/0963689721999617.

III.1.2. Sinteza și printarea 3D a formulărilor printabile pe bază de gelatină, nanofibre de celuloză, K-carragenan și oxid de grafenă carboxilat

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

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

Subactivitatea 1.4. *Printarea 3D cu formulări printabile 4D și formulări printabile 4D cu celule..*

III.1.2.1. Introducere

În ultimele decenii, strategiile de regenerare osoasă au evoluat dincolo de simpla utilizare a biomaterialelor, accentul fiind pus pe dezvoltarea unor sisteme funcționalizate, capabile să interacționeze activ cu mediul biologic. O direcție tot mai explorată este cea a compozitelor pe bază de biopolimeri naturali, care pot fi procesați prin tehnici avansate de fabricație, precum printarea 3D, pentru a genera scaffolduri cu arhitecturi controlate și proprietăți adaptate nevoilor clinice. Această abordare permite integrarea unor componente complementare precum materiale polimerice, nanostructuri și agenți bioactivi într-o singură formulare, rezultând sisteme hibride cu potențial superior de regenerare.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

În acest context, gelatina și κ -carragenanul se remarcă prin proprietățile lor vâscoelastice și biocompatibile, nanofibrele de celuloză (CNF) aduc rezistență mecanică, cresc potențialul de a obține scaffolduri stabile cu arhitectură bine definită. Etapa anterioară a proiectului a vizat optimizarea acestor compoziții de bază și evaluarea comportamentului lor la printare, iar în etapa curentă este prevăzut un pas suplimentar prin introducerea oxidului de grafenă funcționalizat cu grupări carboxil (GO-COOH) în formulările existente. Această completare a urmărit nu doar îmbunătățirea proprietăților mecanice ale scaffoldurilor, ci și obținerea unor suprafețe mai favorabile interacțiunii celulelor, având în vedere potențialul GO-COOH de a modula răspunsul biologic. Prin urmare, investigațiile desfășurate în această lună au vizat analiza influenței GO-COOH asupra printabilității și stabilității compozițiilor pe bază de gelatină/ κ -carragenan/CNF, consolidând direcția de dezvoltare a unor substituenți osoși personalizați și biofuncționalizați.

III.1.2.2. Materiale și metode

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

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

III.1.2.2.1. Materiale utilizate

Gelatină obținută din piele de pește, κ -carragenan, clorura de calciu și genipin au fost achiziționate de la Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, SUA). Oxidul de grafenă carboxilat a fost achiziționat de la ACS Materials LLC (Pasadena, CA, USA), iar nanofibrele de celuloză au fost achiziționate de la Novarials (USA).

III.1.2.2.2. Sinteza formulărilor printabile

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

Formulările printabile utilizate pentru obținerea scaffoldurilor au fost fabricate pe baza

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

unei matrice polimerice naturale, ranforsate cu GO-COOH, codificate cu denumirea GCKG, care reflectă compoziția utilizată: G - gelatină, K - κ -carragenan, C - nanofibre de celuloză (CNF) și GO-COOH.

Formularea GCKG a fost preparată într-un pahar Berzelius prin dizolvarea a 3.71 g gelatină în 37.14 mL apă distilată, sub agitare magnetică, până la dizolvare completă. Ulterior, s-au adăugat 13 mL suspensie CNF 1%, amestecul fiind menținut sub agitare magnetică timp de 1 oră, pentru a asigura o omogenizare corespunzătoare. În etapa următoare, au fost introduse treptat 0.74 g κ -carragenan, iar sistemul a fost lăsat sub agitare peste noapte, pentru a permite hidratarea și integrarea completă a polizaharidului în matrice.

Pentru funcționalizarea suplimentară a formulării, au fost adăugați 11.4 mL dispersie apoasă de GO-COOH, 1 mg/mL. Dispersia a fost obținută separat, prin ultrasonicare timp de 1 oră la amplitudine de 30%, utilizând un regim pulsatoriu de 20 s activ / 5 s pauză, pentru a asigura exfolierea și dispersia uniformă a materialului. Amestecul final a fost păstrat sub agitare până la omogenizare completă și utilizat ulterior pentru testele de printare 3D prin introducerea în cartușuri de printare.

Tabelul 1 – Concentrațiile utilizate în realizarea formulărilor printabile.

COD	Gelatină	Nanofibre de celuloză	K- carragenan	GO- COOH	Clorură de calciu	Genipin
GCK	10%	0.35%	2%		2%	0.1%
GCKG	10%	0.35%	2%	0.25%	2%	0.1%

III.1.2.2.3. Printarea formulărilor sintetizate

Printarea formulărilor sintetizate a fost realizată utilizând imprimanta CELLINK, prin tehnica extrudării pneumatice. În funcție de proprietățile reologice ale formulărilor, parametrii

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

de printare (presiunea de extrudare și viteza de deplasare a capului de printare) au fost ajustați pentru a maximiza fidelitatea de printare.

În urma testelor anterioare, s-a constatat că utilizarea acului 22G oferă cea mai bună printabilitate, asigurând o extrudare continuă și controlată, fără întreruperi sau blocaje, iar scaffoldurile rezultate au prezentat o fidelitate geometrică superioară, fiind cele mai apropiate ca formă și dimensiuni de modelul de referință.

Structurile printate 3D au fost supuse unui proces de dublă reticulare, utilizând o soluție de clorură de calciu 2% timp de 5 minute, pentru reticularea K-carragenanului, și o soluție de genipin 0.1% timp de 24 ore, pentru reticularea gelatinei.

III.1.2.3. Rezultate și discuții

Subactivitatea 1.4. *Printarea 3D cu formulări printabile 4D și formulări printabile 4D cu celule.*

Rezultatele obținute în urma experimentelor de printare 3D sunt prezentate în tabelul 2. Pentru optimizarea procesului, s-au utilizat diferiți parametri de printare, precum presiunea de extrudare și viteza de deplasare a acului de printare.

Formularea GCKG, compusă din 10% gelatină, 0.35% CNF, 2% κ -carragenan și 0.25% GO-COOH (raportat la masa totală de gelatină și κ -carragenan), a fost supusă unei serii de teste de printare pentru evaluarea capacității de extrudare și stabilitate structurală a scaffoldurilor fabricate. Experimentele au urmărit atât identificarea parametrilor de proces adecvați, cât și reproducibilitatea rezultatelor în condiții similare. Principalii parametri analizați au fost presiunea de extrudare, viteza de printare, procentul de umplere și consistența filamentului depus, iar criteriile de evaluare au inclus fidelitatea geometrică, uniformitatea porilor și stabilitatea structurală.

Etapa inițială de optimizare a presiunii și vitezei a constatat în extrudarea unor filamente simple, în vederea determinării presiunii minime necesare pentru un flux continuu de material.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

La o presiune de 60 kPa și o temperatură de 30°C, acul de 22G a permis obținerea unui filament stabil și uniform, confirmând compatibilitatea formulării cu parametrii selectați. Repetarea testului a arătat o reproducibilitate bună, ceea ce a oferit rezultate favorabile pentru trecerea la modele tridimensionale.

În cadrul printării structurilor 3D de dimensiuni $15 \times 15 \times 5$ mm, presiunea de 60 kPa și o viteză de 7 mm/s au fost utilizate inițial (poziția 3). Deși alegerea vitezei scăzute a avut ca scop menținerea uniformității depunerii, au fost observate întreruperi ale filamentului și defecte de printare, indicând o relație directă între parametri de extrudare și proprietățile fizico-reologice ale formulării. Creșterea presiunii la 63 kPa (poziția 4) a îmbunătățit fidelitatea de printare, dar a generat defecte vizibile la pereții interiori în straturile superioare. O presiune și mai ridicată, de 65 kPa (poziția 5), a condus la o ușoară ameliorare a uniformității, însă defectele nu au fost complet eliminate. Aceste observații arată că o simplă creștere a presiunii nu rezolvă complet problemele de continuitate și uniformitate, ci poate chiar să inducă variații suplimentare, mai ales la pereții interiori ai scaffoldului.

Pentru confirmarea parametrilor optimi preliminari, au fost realizate experimente de printare la presiunea de 65 kPa și viteza de 7 mm/s (pozițiile 6–7), iar scaffoldurile au prezentat pori pătrați, bine definiți și continui, cu straturi uniforme și stabile. Structurile obținute s-au autosusținut sub propria greutate, ceea ce sugerează o adecvare bună a acestor parametri pentru formularea GCKG. Totuși, menținerea constantă a parametrilor nu a garantat absența defectelor, astfel că în proba ulterioară (poziția 8), au apărut întreruperi ale filamentului și pereți neuniformi, probabil din cauza blocării duzei. Această observație subliniază importanța monitorizării constante a importanței fiecărui parametru asupra procesului de printare, influențând fidelitatea de printare a structurilor finale, chiar și atunci când parametrii de bază sunt bine ajustați.

Pentru a reduce presiunea aplicată, cu impact direct asupra viabilității celulare în aplicațiile de bioprintare vizate, s-a testat presiunea de 60 kPa concomitent cu scăderea vitezei

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

la 6.5 mm/s (pozițiile 9–10). Rezultatele au arătat o printabilitate bună, cu straturi uniforme și o structură stabilă. Repetarea experimentului a confirmat reproducibilitatea, deși au fost observate defecte minore la un perete exterior al unui scaffold. Modificarea procentului de umplere la 25% (poziția 11) a dus la deformarea modelului, confirmând că 20% reprezintă o valoare mai adecvată pentru această formulare, menținând echilibrul între stabilitate și fidelitatea formei.

La aceiași parametri (60 kPa, 6.5 mm/s, 20% umplere), au fost obținute mai multe structuri (pozițiile 12–14), care au demonstrat o bună fidelitate a printării, pori pătrați și straturi uniforme. Totuși, s-au remarcat defecte minore la intersecțiile filamentelor, atribuite acumulărilor locale de material. Într-o situație distinctă (poziția 15), un scaffold a prezentat un număr ridicat de defecte, generate nu de parametrii în sine, ci de epuizarea aproape completă a materialului din cartuș, ceea ce evidențiază încă o dată importanța parametrilor operaționali asupra calității produsului final. După schimbarea cartușului (poziția 16), scaffoldul a prezentat din nou defecte moderate, precum pereți deformați sau lipsa materialului într-un colț, ceea ce indică și o sensibilitate a formulării la continuitatea procesului de extrudare.

Scăderea vitezei la 6.4 mm/s (poziția 17) a condus la o îmbunătățire vizibilă a uniformității scaffoldului, cu pereți mai stabili, dar structura porilor a rămas parțial neuniformă. Creșterea presiunii la 63 kPa (poziția 18) a determinat o ameliorare suplimentară, scaffoldul obținut având pereți mai bine aliniați și straturi uniforme, confirmând astfel capacitatea de autosusținere. Totuși, repetarea experimentului la aceiași parametri (poziția 19) a generat defecte, cu întreruperi de filament și acumulări de material, ceea ce indică faptul că stabilitatea procesului rămâne dependentă de factori externi, precum constanța fluxului sau starea duzei.

În continuare, creșterea presiunii la 65 kPa, menținând viteza la 6.4 mm/s (poziția 20), nu a condus la o îmbunătățire consistentă, scaffoldul prezentând defecte evidente și pori neuniformi. Continuarea testelor cu 67 kPa și 6.3 mm/s (poziția 21) sau chiar 69 kPa și 6.2 mm/s (poziția 22) a agravat defectele, cu întreruperi de filament și porozitate inegală. 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

comportament confirmă faptul că presiunea excesivă poate destabiliza procesul, generând acumulări locale și diminuând fidelitatea formei.

În final, cele mai bune rezultate au fost obținute la o presiune de 65 kPa și o viteză de 6.2 mm/s (pozițiile 23–28). Scaffoldurile fabricate în aceste condiții au prezentat pereți bine definiți, contururi clare ale porilor și o distribuție apropiată de modelul teoretic. Straturile au fost uniforme și stabile, fără întreruperi vizibile sau acumulări excesive de material. În plus, repetabilitatea acestor rezultate a fost ridicată, mai multe scaffolduri confirmând fidelitatea procesului. Această combinație de parametri asigură un control adecvat al extrudării și o arhitectură finală reproductibilă, ceea ce o recomandă drept set optim pentru formularea GCKG.

Comparând rezultatele obținute, se poate observa că intervalul optim pentru presiune se situează în jurul valorii de 60–65 kPa, însă valorile mai mari de 67–69 kPa au compromis fidelitatea printării, generând defecte și neuniformități. În ceea ce privește viteza, o valoare de aproximativ 6.2 mm/s s-a dovedit a fi cea mai potrivită, permițând echilibrul între extrudare continuă și depunerea uniformă a filamentelor. De asemenea, procentul de umplere a fost un factor critic: 20% a permis obținerea unor structuri stabile și cu porozitate bine definită, în timp ce valori mai mari au condus la deformări.

Aceste rezultate evidențiază faptul că optimizarea procesului de printare pentru formularea GCKG nu depinde doar de parametrii principali, ci și de stabilitatea sistemului de extrudare și de controlul strict al condițiilor operaționale. Blocarea duzei, cantitatea de material rămasă în cartuș sau mici variații în flux pot afecta semnificativ calitatea produsului final, chiar și atunci când setările sunt considerate optime. Prin urmare, pentru aplicarea ulterioară în bioprintare, unde viabilitatea celulară și reproducibilitatea geometrică sunt esențiale, menținerea unui echilibru între presiune scăzută și fidelitate structurală rămâne o prioritate.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

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. Optimizarea parametrilor de printare pentru compoziția GCKG.

GCKG			
Concentrații: 10% Gelatină/0.35% Nanofibre celuloză/2% K-carragenan/0.25% GO-COOH (raportat la masa de polimeri)			
Nr. Crt	Parametrii de printare	Imagini printare	Observații printare
1	Model: linie Diametru acului de printare: 22G Temperatură: 30°C Presiune: 60kPa		<i>În faza inițială s-a testat capacitatea de formare a filamentului la o presiune de 60 kPa. S-a determinat că această presiune este optimă pentru obținerea unui filament continuu la temperatura de 30 °C</i>
2	Model: linie Diametru acului de printare: 22G Temperatură: 30°C Presiune: 60kPa		<i>Pentru validarea reproductibilității, s-au testat aceiași parametri, iar rezultatul a confirmat capacitatea acestora de a produce un filament continuu, fără întreruperi</i>

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

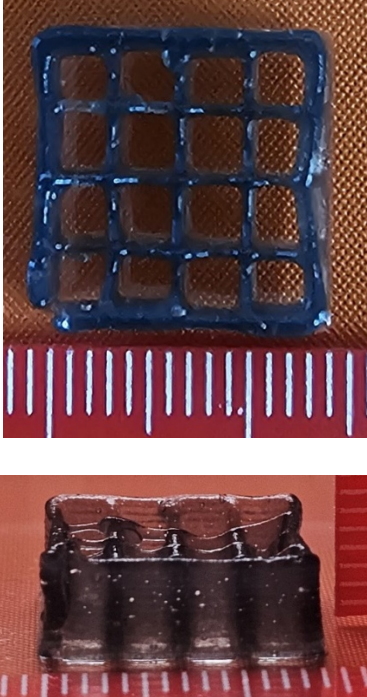
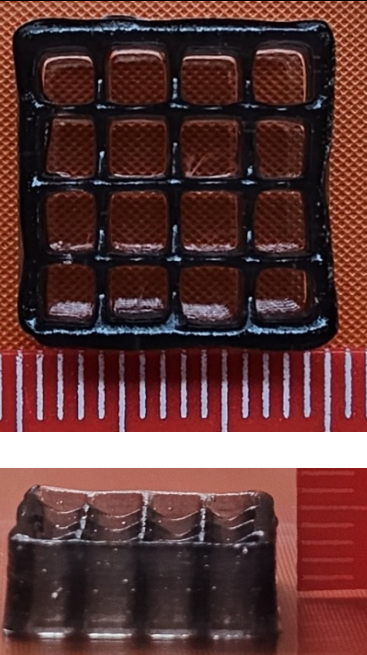
Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

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: 15x15x5 mm Diametru acului de printare: 22G Procentul de umplere: 20% Temperatură: 30°C Presiune: 60kPa Viteza de printare: 7 mm/s		<i>Presiunea de printare a fost selectată pe baza rezultatelor anterioare privind extrudarea filamentului, iar viteza de printare a fost aleasă cu o valoare de 7 mm/s, pentru a permite depunerea uniformă a straturilor. Cu toate acestea, s-a observat prezența unor defecte de printare și întreruperi de filament, care indică necesitatea optimizării parametrilor.</i>
4	Dimensiunile selectate: 15x15x5 mm Diametru acului de printare: 22G Procentul de umplere: 20% Temperatură: 30°C Presiune: 63 kPa Viteza de printare: 7 mm/s		<i>Pentru optimizarea parametrilor, presiunea de printare a fost crescută la 63 kPa, iar această modificare a dus la o mai bună fidelitate la printare. Cu toate acestea, imaginea laterală indică defecte ale pereților interiori, observate în straturile superioare.</i>

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

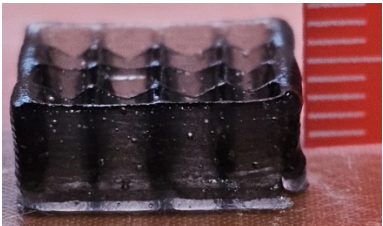
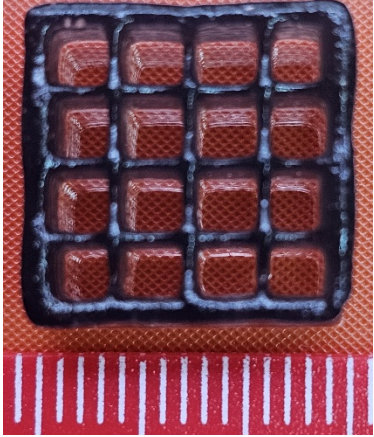
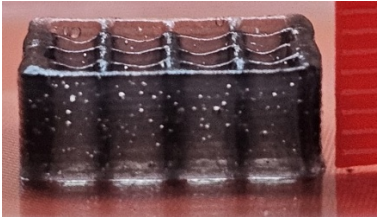
Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

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: 15x15x5 mm Diametru acului de printare: 22G Procentul de umplere: 20% Temperatură: 30°C Presiune: 65 kPa Viteza de printare: 7 mm/s	 	<i>Presiunea de printare a fost crescută la 65 kPa, menținându-se aceeași viteză de printare, iar această modificare a dus la o ușoară îmbunătățire a fidelității de printare.</i>
6	Dimensiunile selectate: 15x15x5 mm Diametru acului de printare: 22G Procentul de umplere: 20% Temperatură: 30°C Presiune: 65 kPa Viteza de printare: 7 mm/s	 	<i>Menținerea constantă a presiunii și a vitezei de printare a permis obținerea unor scaffolduri cu pori pătrați, bine definiți și continui. Straturile depuse au prezentat uniformitate și stabilitate, confirmând că structurile pot fi susținute de propria greutate. Aceste observații arată că parametrii selectați pot fi considerați adecvați pentru printarea acestor formulări.</i>

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

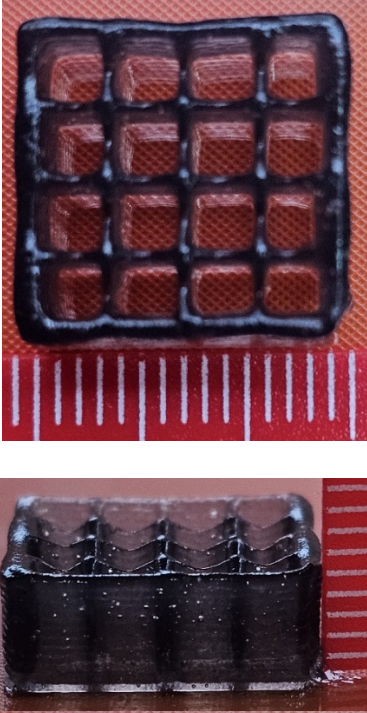
Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

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

7	Dimensiunile selectate: 15x15x5 mm Diametru acului de printare: 22G Procentul de umplere: 20% Temperatură: 30°C Presiune: 65 kPa Viteza de printare: 7 mm/s		<i>În continuare, controlul presiunii și al vitezei de printare a condus la obținerea unor scaffolduri cu pori pătrați, bine definiți și fără discontinuități. Straturile au fost depuse uniform și au rămas stabile, ceea ce demonstrează capacitatea structurilor de a se autosusține.</i>
8	Dimensiunile selectate: 15x15x5 mm Diametru acului de printare: 22G Procentul de umplere: 20% Temperatură: 30°C Presiune: 65 kPa Viteza de printare: 7 mm/s		<i>În ciuda menținerii parametrilor optimi, s-a observat apariția unor defecte de printare, posibil cauzate de blocarea duzei de extrudare. Scaffoldul obținut prezintă pereți interiori și exteriori neuniformi, din cauza întreruperii filamentului extrudat.</i>

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

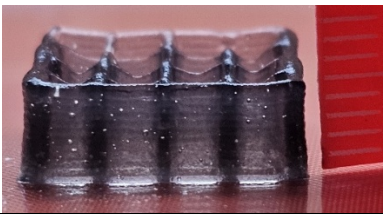
Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

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

			
9	Dimensiunile selectate: 15x15x5 mm Diametru acului de printare: 22G Procentul de umplere: 20% Temperatură: 30°C Presiune: 60 kPa Viteza de printare: 6.5 mm/s	 	<i>Pentru a reduce presiunea de printare, care poate afecta viabilitatea celulară în timpul bioprintării vizate, s-a decis utilizarea unei presiuni de 60 kPa, cu o viteză de printare mai mica (6.5 mm/s), pentru a menține fidelitatea de printare. Scaffoldul obținut a indicat o printabilitate adecvată, straturi care sunt susținute sub propria greutate.</i>

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

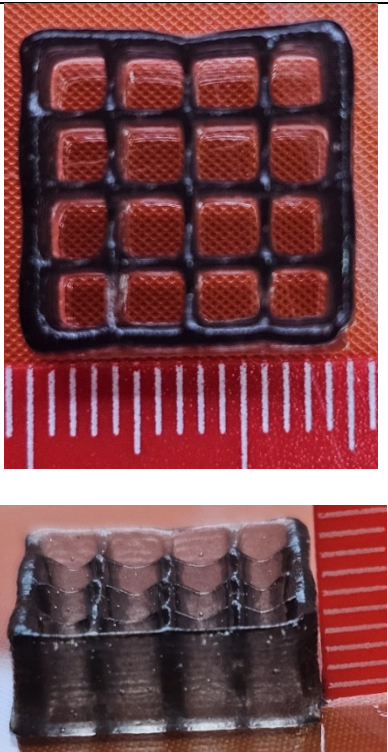
Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

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

10	Dimensiunile selectate: 15x15x5 mm Diametru acului de printare: 22G Procentul de umplere: 20% Temperatură: 30°C Presiune: 60 kPa Viteza de printare: 6.5 mm/s		<i>Printarea scaffoldului a fost repetată utilizând aceeași parametri pentru testarea reproductibilității. S-a observat o fidelitate de printare îmbunătățită, cu excepția unui singur perete exterior. Porii au prezentat o formă pătrată, apropiată de cea a modelului teoretic.</i>
11	Dimensiunile selectate: 15x15x5 mm Diametru acului de printare: 22G Procentul de umplere: 25% Temperatură: 30°C Presiune: 60 kPa Viteza de printare: 6.5 mm/s		<i>Modelul prezent a indicat o formă neregulată, din cauza selectării unui procent de umplere de 25%, în loc de 20%, cum a fost folosit anterior.</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

12	Dimensiunile selectate: 15x15x5 mm Diametru acului de printare: 22G Procentul de umplere: 20% Temperatură: 30°C Presiune: 60 kPa Viteza de printare: 6.5 mm/s		Selectarea procentului de umplere de 20% și a parametrilor de printare optimi (presiune de 60 kPa și viteză de printare de 6.5 mm/s) a condus la obținerea unui scaffold cu pori pătrați, bine definiți și fără întreruperi sau aglomerări de material. Straturile depuse au fost uniforme și stabile, demonstrând că structurile se susțin sub propria greutate.
13	Dimensiunile selectate: 15x15x5 mm Diametru acului de printare: 22G Procentul de umplere: 20% Temperatură: 30°C Presiune: 60 kPa Viteza de printare: 6.5 mm/s		Scaffoldul printat cu parametrii optimizați a prezentat o fidelitate bună de printare, cu mici defecte din cauza aglomerărilor de material la intersecția filamentelor.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

14	Dimensiunile selectate: 15x15x5 mm Diametru acului de printare: 22G Procentul de umplere: 20% Temperatură: 30°C Presiune: 60 kPa Viteza de printare: 6.5 mm/s		<i>Din nou s-a observat că scaffoldul obținut prin utilizarea parametrilor selecți a prezentat o bună fidelitate de printare, cu defecte minore generate de acumulările de material la nivelul intersecțiilor filamentelor.</i>
15	Dimensiunile selectate: 15x15x5 mm Diametru acului de printare: 22G Procentul de umplere: 20% Temperatură: 30°C Presiune: 60 kPa Viteza de printare: 6.5 mm/s		<i>Deși au fost menținute parametrii optimi de printare, scaffoldul obținut a prezentat un număr ridicat de defecte, generate de cantitatea insuficientă de formulare printabilă rămasă în cartuș în timpul procesului de fabricare.</i>

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

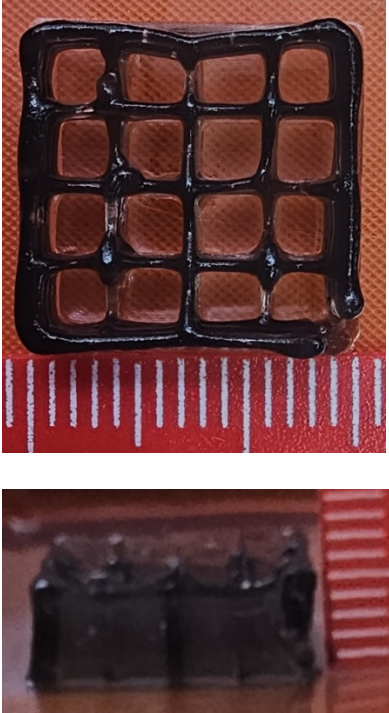
Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

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

16	Dimensiunile selectate: 15x15x5 mm Diametru acului de printare: 22G Procentul de umplere: 20% Temperatură: 30°C Presiune: 60 kPa Viteza de printare: 6.5 mm/s		<i>După schimbarea cartușului, scaffoldul printat utilizând parametrii optimi a prezentat anumite defecte, evidențiate prin pereți ușor deformați, acumulări locale de material și absența parțială a materialului într-unul dintre colțuri.</i>
17	Dimensiunile selectate: 15x15x5 mm Diametru acului de printare: 22G Procentul de umplere: 20% Temperatură: 30°C Presiune: 60 kPa Viteza de printare: 6.4 mm/s		<i>Reducerea vitezei de printare la 6.4 mm/s a condus la obținerea unui scaffold cu o fidelitate structurală mai bună, caracterizat prin straturi mai uniforme și o stabilitate crescută a depunerii. Cu toate acestea, s-a observat persistența unui perete ușor deformat, iar distribuția porilor nu a atins un grad complet de uniformitate, indicând că</i>

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

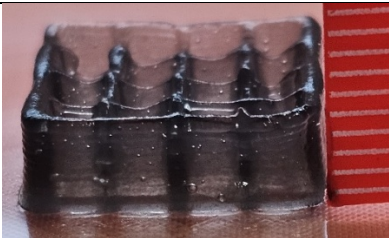
Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

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

			<i>parametrii utilizați necesită ajustări suplimentare pentru optimizarea arhitecturii finale.</i>
18	Dimensiunile selectate: 15x15x5 mm Diametru acului de printare: 22G Procentul de umplere: 20% Temperatură: 30°C Presiune: 63 kPa Viteza de printare: 6.4 mm/s	 	<i>La o viteză de 6.4 mm/s și o presiune crescută la 63 kPa, scaffoldul obținut a prezentat o îmbunătățire vizibilă a fidelității de printare, cu pereți mai bine aliniați și mai stabili. Distribuția porilor a fost mai uniformă, iar straturile depuse au prezentat uniformitate și stabilitate, ceea ce a confirmat capacitatea structurilor de a se autosusține sub propria greutate.</i>

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

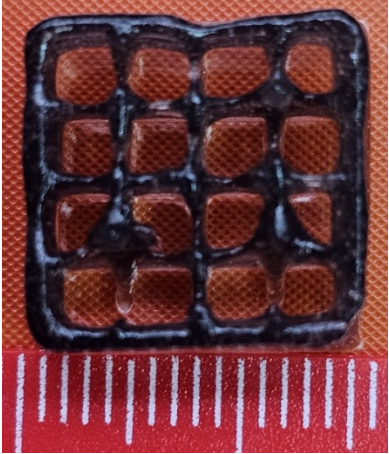
Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

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

19	Dimensiunile selectate: 15x15x5 mm Diametru acului de printare: 22G Procentul de umplere: 20% Temperatură: 30°C Presiune: 63 kPa Viteza de printare: 6.4 mm/s	 	<i>Scaffoldul printat utilizând aceiași parametri optimizați, a prezentat defecte sub forma unor întreruperi ale filamentelor, care au condus la depuneri excesive de material în anumite zone.</i>
20	Dimensiunile selectate: 15x15x5 mm Diametru acului de printare: 22G Procentul de umplere: 20% Temperatură: 30°C Presiune: 65 kPa Viteza de printare: 6.4 mm/s	 	<i>Pentru a îmbunătăți fidelitatea de printare, a fost crescută presiunea la 65 kPa, însă scaffoldul obținut a prezentat în continuare defecte evidente, constând în întreruperi ale filamentelor și acumulări locale de material, ceea ce a condus la o distribuție neuniformă a porilor.</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

21	Dimensiunile selectate: 15x15x5 mm Diametru acului de printare: 22G Procentul de umplere: 20% Temperatură: 30°C Presiune: 67 kPa Viteza de printare: 6.3 mm/s	 	<i>După creșterea presiunii de printare la 67 kPa și scăderea vitezei la 6.3 mm/s, scaffoldul obținut a prezentat din nou defecte, manifestate prin întreruperi ale filamentelor și acumulări locale de material.</i>
22	Dimensiunile selectate: 15x15x5 mm Diametru acului de printare: 22G Procentul de umplere: 20% Temperatură: 30°C Presiune: 69 kPa Viteza de printare: 6.2 mm/s	 	<i>La o presiune de 69 kPa și o viteză redusă la 6.2 mm/s, scaffoldul a prezentat un număr mai mare de defecte, evidențiate prin neuniformitatea porilor și discontinuități ale depunerii filamentului.</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

23	Dimensiunile selectate: 15x15x5 mm Diametru acului de printare: 22G Procentul de umplere: 20% Temperatură: 30°C Presiune: 65 kPa Viteza de printare: 6.2 mm/s		<i>La parametrii de 65 kPa și o viteză de 6.2 mm/s, scaffoldul a prezentat o fidelitate de printare ridicată, cu pereți bine definiți și contururi clare ale porilor. Straturile depuse au fost uniforme și stabile, fără întreruperi vizibile ale filamentelor sau acumulări excesive de material.</i> <i>Distribuția porilor a fost apropiată de cea a modelului teoretic, ceea ce indică un control bun al procesului de extrudare. Aceste rezultate arată că această combinație de parametri este favorabilă pentru obținerea unor structuri reproductibile și stabile.</i>
----	---	--	---

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

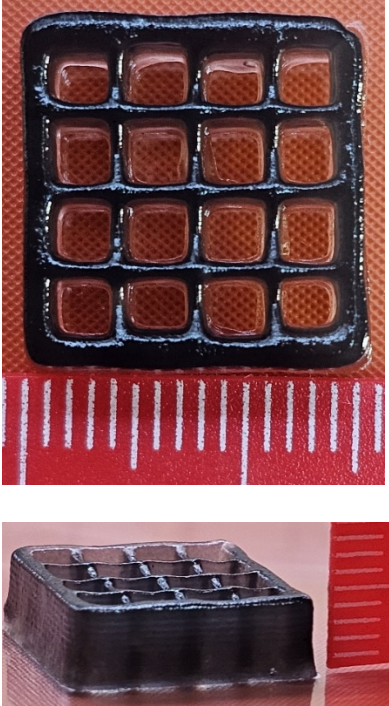
Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

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

24	Dimensiunile selectate: 15x15x5 mm Diametru acului de printare: 22G Procentul de umplere: 20% Temperatură: 30°C Presiune: 65 kPa Viteza de printare: 6.2 mm/s		<i>La parametrii de 65 kPa și o viteză de 6.2 mm/s, scaffoldul a prezentat o fidelitate de printare ridicată, cu pereți bine definiți și contururi clare ale porilor. Straturile depuse au fost uniforme și stabile, fără întreruperi vizibile ale filamentelor sau acumulări excesive de material.</i> <i>Distribuția porilor a fost apropiată de cea a modelului teoretic, ceea ce indică un control bun al procesului de extrudare. Aceste rezultate arată că această combinație de parametri este favorabilă pentru obținerea unor structuri reproductibile și stabile.</i>
----	---	--	---

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

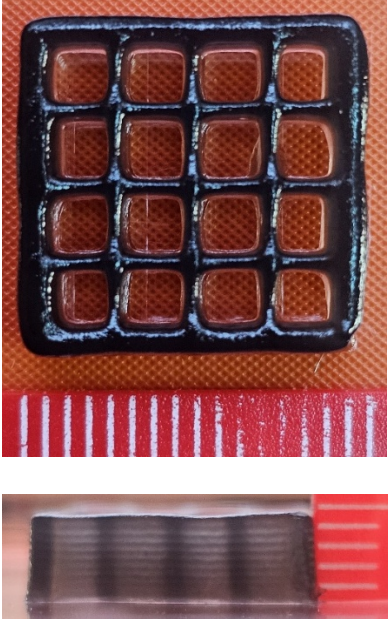
Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

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

25	Dimensiunile selectate: 15x15x5 mm Diametru acului de printare: 22G Procentul de umplere: 20% Temperatură: 30°C Presiune: 65 kPa Viteza de printare: 6.2 mm/s		<i>La parametrii de 65 kPa și o viteză de 6.2 mm/s, scaffoldul a prezentat o fidelitate de printare ridicată, cu pereți bine definiți și contururi clare ale porilor. Straturile depuse au fost uniforme și stabile, fără întreruperi vizibile ale filamentelor sau acumulări excesive de material.</i> <i>Distribuția porilor a fost apropiată de cea a modelului teoretic, ceea ce indică un control bun al procesului de extrudare. Aceste rezultate arată că această combinație de parametri este favorabilă pentru obținerea unor structuri reproductibile și stabile.</i>
26	Dimensiunile selectate: 15x15x5 mm Diametru acului de printare: 22G Procentul de umplere: 20% Temperatură: 30°C Presiune: 65 kPa		<i>La parametrii de 65 kPa și o viteză de 6.2 mm/s, scaffoldul a prezentat o fidelitate de printare ridicată, cu pereți bine definiți și contururi clare ale porilor. Straturile depuse au fost uniforme și stabile, fără întreruperi vizibile ale</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

	Viteza de printare: 6.2 mm/s		<i>filamentelor sau acumulări excesive de material. Distribuția porilor a fost apropiată de cea a modelului teoretic, ceea ce indică un control bun al procesului de extrudare. Aceste rezultate arată că această combinație de parametri este favorabilă pentru obținerea unor structuri reproductibile și stabile.</i>
27	Dimensiunile selectate: 15x15x5 mm Diametru acului de printare: 22G Procentul de umplere: 20% Temperatură: 30°C Presiune: 65 kPa Viteza de printare: 6.2 mm/s		<i>La parametrii de 65 kPa și o viteză de 6.2 mm/s, scaffoldul a prezentat o fidelitate de printare ridicată, cu pereți bine definiți și contururi clare ale porilor. Straturile depuse au fost uniforme și stabile, fără întreruperi vizibile ale filamentelor sau acumulări excesive de material. Distribuția porilor a fost apropiată de cea a modelului teoretic, ceea ce indică un control bun al procesului de extrudare. Aceste rezultate arată că această combinație</i>

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

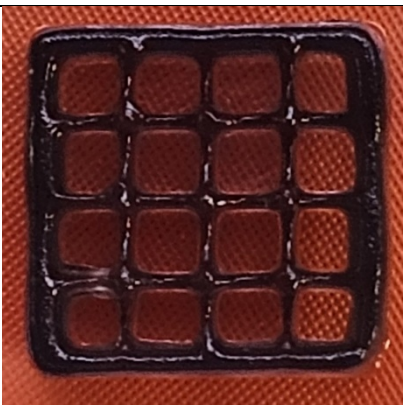
Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

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

			<i>de parametri este favorabilă pentru obținerea unor structuri reproductibile și stabile.</i>
28	Dimensiunile selectate: 15x15x5 mm Diametru acului de printare: 22G Procentul de umplere: 20% Temperatură: 30°C Presiune: 65 kPa Viteza de printare: 6.2 mm/s		<i>La parametrii de 65 kPa și o viteză de 6.2 mm/s, scaffoldul a prezentat o fidelitate de printare ridicată, cu pereți bine definiți și contururi clare ale porilor. Straturile depuse au fost uniforme și stabile, fără întreruperi vizibile ale filamentelor sau acumulări excesive de material.</i> <i>Distribuția porilor a fost apropiată de cea a modelului teoretic, ceea ce indică un control bun al procesului de extrudare. Aceste rezultate arată că această combinație de parametri este favorabilă pentru obținerea unor structuri reproductibile și stabile.</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

III.1.2.4. Concluzii

Investigațiile realizate asupra formulării GCKG, bazată pe gelatină, κ -carragenan, CNFși GO-COOH, au arătat că succesul procesului de printare 3D depinde în mod direct de alegerea atentă a parametrilor. Experimentele inițiale au confirmat că o presiune de 60 kPa permite extrudarea stabilă a filamentului și o bună reproductibilitate, însă ajustările ulterioare au demonstrat că performanța scaffoldurilor poate fi îmbunătățită printr-un control mai fin al presiunii și vitezei. De asemenea, valori mai mari de presiune, peste 65 kPa, au dus la apariția de discontinuități și acumulări locale de material, compromițând uniformitatea arhitecturii poroase.

Rezultatele au evidențiat că utilizarea unei viteze de 6.2 mm/s împreună cu o presiune de 65 kPa reprezintă combinația optimă, favorizând obținerea unor structuri bine conturate, cu pereți stabili și pori de formă pătrată, apropiată de modelul teoretic. În plus, procentul de umplere a influențat semnificativ rezultatele: la 20% s-au obținut structuri regulate și stabile, în timp ce creșterea la 25% a determinat deformarea modelului și pierderea fidelității geometrice.

În ansamblu, rezultatele confirmă că formularea GCKG poate fi procesată eficient prin printare 3D, iar parametrii optimizați identificați în cadrul acestui studiu permit obținerea unor scaffolduri reproductibile, cu fidelitate ridicată și o arhitectură controlată. Aceste caracteristici fac ca formularea să fie potrivită pentru dezvoltarea de structuri funcționale destinate aplicațiilor viitoare în domeniul ingineriei tisulare.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE
POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

CONCLUZII GENERALE

În Etapa IX, desfășurată în perioada iulie–septembrie 2025, în cadrul proiectului **REOSTEOMI** s-au consolidat cercetările dedicate dezvoltării de biomateriale și tehnologii de printare 3D pentru regenerarea osoasă asociată mielomului multiplu. Obiectivul principal al acestei etape a fost obținerea de scaffolduri personalizate cu proprietăți nanomecanice, reologice și biologice optimizate, capabile să reproducă arhitectura naturală a osului și să ofere suport funcțional pentru atașarea și proliferarea celulară.

Rezultatele obținute au demonstrat rolul esențial al oxidului de grafenă (GO) în îmbunătățirea performanțelor mecanice. Testele de nanoindentare au arătat că scaffoldurile fără GO (GG) au prezentat un modul elastic G' de **$9,39 \pm 3,95$ kPa** și un modul viscoelastic G'' de **$4,32 \pm 1,12$ kPa**, valori relativ scăzute pentru aplicabilitate clinică. Introducerea unei concentrații reduse de GO (0,125%, proba GG-12GO) a determinat o creștere semnificativă a rigidității, cu G' de **$19,48 \pm 1,43$ kPa**, dublu față de martor, în timp ce G'' s-a menținut la **$5,00 \pm 0,68$ kPa**, confirmând păstrarea flexibilității necesare integrării biologice. În schimb, la concentrații mai mari de GO, proprietățile mecanice au scăzut: la 0,25% $G' = 11,85 \pm 1,41$ kPa, $G'' = 0,94 \pm 0,27$ kPa, iar la 0,50% $G' = 7,46 \pm 1,52$ kPa, $G'' = 1,33 \pm 1,35$ kPa, sugerând că doze excesive de GO induc agregare și destabilizare a rețelei polimerice.

Studiile reologice au confirmat aceste observații, toate formulările prezentând un comportament de tip shear-thinning, favorabil procesului de extrudare strat-cu-strat. Formulările fără GO au arătat o scădere accentuată a vâscozității la creșterea vitezei de forfecare, ceea ce indică instabilitate structurală. În schimb, probele cu 0,125% GO au prezentat o reducere mai moderată a vâscozității, confirmând consolidarea rețelei interne și o mai bună fidelitate geometrică la printare. În testele oscilatorii, toate formulările au menținut $G' > G''$ pe intervalul de frecvență 0,1–10 Hz, ceea ce demonstrează caracterul elastic predominant și stabilitatea structurală necesară obținerii de scaffolduri funcționale.

În paralel, au fost dezvoltate și scaffolduri hibride din gelatină, κ -carragenan și nanofibre de celuloză (CNF), ranforsate cu GO carboxilat. Printarea 3D a fost optimizată prin ajustarea parametrilor (presiune 20–30 kPa, viteză 8–12 mm/s, ac 22G), iar rezultatele au indicat o fidelitate ridicată a structurilor obținute în comparație cu modelele CAD. Cele mai bune rezultate au fost obținute la **30 kPa și 8 mm/s**, când scaffoldurile au prezentat pori pătrați și stabilitate structurală superioară, fără tendințe de colaps.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

Testele Live/Dead efectuate la 1, 4, 7 și 14 zile au evidențiat menținerea unei proporții mari de celule viabile, ceea ce confirmă biocompatibilitatea și relevanța acestor materiale pentru aplicații clinice.

În ansamblu, rezultatele acestei etape arată că integrarea GO în concentrații reduse ($\approx 0,125\%$) oferă un echilibru optim între rigiditate și flexibilitate, în timp ce utilizarea CNF și κ -carragenan contribuie la stabilitatea și printabilitatea scaffoldurilor. Aceste date validează strategia științifică a proiectului și fundamentează pașii următori, care vor viza evaluări biologice avansate și teste funcționale în condiții simulate, în vederea transpunerii clinice.

Anexă

a. Articole publicate:

1. Vlăsceanu, G. M., Zamfir, C. I., Baltă, C., Herman, H., Ciceu, A., Duma, M. A., Ioniță, M., Popescu, C., & Hermenean, A. Functionalized Reduced Graphene Oxide-Based Nanocomposite Hydrogels for Enhanced Osteogenesis in Bone Tissue Engineering, Advanced Healthcare Materials, FI 10.0 2025, <https://doi.org/10.1002/adhm.202501941>.

2. Dobrisan M.R., Toader A.G., Chiticaru A.E., Vlasceanu G.M., Popescu R.C., Nicoara A.I., Podaru A.I., Toader G., Rotariu T., Ionita M., Nanostructured gelatin-gellan inks double reinforced with cellulose nanofibrils and graphene derivatives for 3D printing in bone regeneration applications, Materials Today Advances. FI 8.0, Volume 28, 2025, 100621, ISSN 2590-0498, <https://doi.org/10.1016/j.mtadv.2025.100621>

b. Articole aflate în diferite etape de evaluare:

1. Cojocar E., Chiticaru A.E., Vlăsceanu G.M., Nicolae M.C., Popescu R.C., Dobrisan M.R., Toader A.G., and Ioniță M., 3D Printing of Multicomponent Polymeric Inks Enables Hierarchical Hybrid Architectures for Bone Tissue Regeneration, Materials Today Advances, FI 8.0.

2. Oprea M., Voicu S.I., Ionita M., “Recent Advances in Nanoparticles-Based Systems for the Treatment of Multiple Myeloma”, Results in chemistry, FI 4.2.

Întocmit de membrii echipei de implementare,

Avizat de responsabilul de proiect,

Ing. Dobrișan Mihaela-Raluca

Prof. Dr. Ing. Mariana IONIȚĂ

Dr. Ing. Chiticaru Elena Alina

Drd. Ing. Toader Georgian Alin

Data: 30.09.2025

Dr. Ing. Cojocar Elena

Dr. Ghiță Alina-Ioana