

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

Raport științific consolidat

Perioada implementare aprilie-iunie 2025

Proiectul REOSTEOMI are ca obiectiv dezvoltarea unor soluții avansate pentru tratamentul afecțiunilor asociate mielomului multiplu (MM), concentrându-se pe tehnologii inovatoare în domeniul biomaterialelor și al ingineriei tisulare. Tehnologia de printare tridimensională (3D) reprezintă o componentă esențială a acestui proiect, permițând fabricarea unor structuri complexe și personalizate, cu proprietăți structurale, morfologice, mecanice și biologice adaptate nevoilor specifice ale pacienților. Această tehnologie permite realizarea de arhitecturi 3D funcționale, capabile să susțină regenerarea tisulară prin imitarea structurii naturale a țesutului osos și prin facilitarea atașării, proliferării și diferențierii celulare.

În completarea tehnologiilor avansate de printare 3D, proiectul REOSTEOMI investighează și utilizarea oligonucleotidelor antisens (ASO) ca soluții terapeutice pentru mielomul multiplu. ASO-urile sunt secvențe de ADN sau ARN cu rol în modularea expresiei genice, prin inhibarea sintezei proteinelor implicate în progresia bolii. Aceste terapii oferă o abordare personalizată și direcționată, reducând efectele secundare și sporind eficiența tratamentului. Integrarea ASO-urilor în scaffoldurile obținute prin printare 3D permite o eliberare controlată și prelungită a moleculelor terapeutice, optimizând interacțiunea acestora cu celulele de mielom multiplu și maximizând impactul terapeutic.

Astfel, în cadrul Etapei 8 a proiectului, desfășurată în perioada aprilie-iunie 2025, activitățile s-au concentrat pe utilizarea tehnologiilor avansate de printare 3D pentru fabricarea de scaffolduri pe bază de gelatină, κ -carragenan și nanofibre de celuloză (CNF). Acestea au fost ulterior înghețate, liofilizate și caracterizate. De asemenea, au fost testate scaffolduri 3D obținute din gumă gellan, CNF și nanofibre electrofilate de chitosan/polietilenoxid (NFs), fiind evaluată stabilitatea acestora. În plus, scaffoldurile fabricate anterior, pe bază de gelatină metacrilată (GelMA), gumă gellan metacrilată (GellanMA) și diferite concentrații de oxid de

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

grafenă (GO), au fost analizate din punct de vedere structural, biologic, precum și în ceea ce privește cinetica de gonflare și degradare.

În paralel, Activitatea 2 de cercetare s-a concentrat pe două direcții principale: (1) obținerea și optimizarea unor platforme avansate pe bază de grafenă carboxilată activată chimic, utilizând EDC-NHS, pentru adsorbția oligonucleotidelor antisens și (2) analiza fluorescentă, structurală și chimică a acestor platforme, înainte și după interacțiunea cu nucleotidele antisens. În cadrul aceleiași direcții de cercetare, a fost realizată și analiza morfologiei platformelor polimerice ranforsate cu materiale carbonice, evidențiindu-se interacțiunea acestora cu celulele atașate. Acest demers a contribuit la o înțelegere aprofundată a modului în care aceste structuri influențează aderența și proliferarea celulară – aspecte esențiale pentru aplicațiile biomedicale și de inginerie tisulară.

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.

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

În cadrul acestei subactivități s-au realizat:

- Formulări printabile din gelatină, K-carragenan și CNF-uri.
- Obținerea de scaffolduri prin printare 3D cu formularea menționată anterior și reticularea acestora utilizând clorură de calciu și genipin.
- Experimente de înghețare a scaffoldurilor.

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 și CNF-uri din punct de vedere al printabilității.

Subactivitatea 1.6. Încorporarea conjugatelor de tip GO-ASO în materialul de printare.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

În cadrul acestei subactivități s-au realizat:

- Formulări printabile din gelatină, K-carragenan și CNF-uri, pentru încărcare cu conjugate GO-COOH/ASO.

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

În cadrul acestei subactivități s-au analizat:

- Analiza structurală a scaffoldurilor din GellanMA, GelMA și diferite concentrații de GO, prin difracție cu raze X.

- Analize privind cinetica de gonflare și stabilitatea scaffoldurilor din GellanMA, GelMA și GO și diferite concentrații de GO.

- Analiza biocompatibilității scaffoldurilor din GellanMA, GelMA și diferite concentrații de GO.

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.

În cadrul acestei subactivități s-au realizat:

- Analize privind stabilitatea scaffoldurilor din GG, CNF și nanofibre de chitosan.

- Sinteza de platforme pe bază de derivați grafenici pentru adsorbția de ASO-uri

- Sinteza de platforme pe bază de derivați grafenici, activate cu EDC-NHS pentru adsorbția de ASO-uri

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

În cadrul acestei subactivități s-a realizat:

- Analiza structurală și chimică a platformelor pe bază de derivați grafenici și activate cu EDC-NHS pentru adsorbția de ASO-uri.

- Analiza concentrației de ASO-uri adsorbite pe suprafața platformelor pe bază de derivați grafenici și activate cu EDC-NHS, utilizând forster resonance energy transfer (FRET).

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

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. Studii privind cinetica de gonflare și stabilitatea structurilor din GelMA, gellan metacrilat și diferite concentrații de oxid de grafenă

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

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

I.1.1.1. Introducere

Utilizarea structurilor de regenerare osoasă din hidrogeluri biodegradabile necesită un control atent atât asupra cineticii de gonflare și degradare, aceștia influențând semnificativ succesul rata de succes regenerării ¹. Acești parametri sunt influențați atât de factorii de mediului cât și de proprietățile materialului. În privința mediului de gonflare și degradare, acesta trebuie să mimeze condițiile specifice regăsite în regiunea în care se dorește implantarea structurii (ex: pH, temperatură). O influență semnificativă asupra celor doi parametri o au atât morfologia și porozitatea structurilor, cât și proprietățile chimice. Astfel, caracterul hidrofil al rețelei, care prezintă un rol cheie în gonflarea și degradarea biomaterialelor, se datorează și prezenței grupărilor chimice funcționale precum hidroxil (-OH), carboxil (-COOH), amino (NH₂), sulfonic (-SO₃H) care pot fi găsite fie în structura polimerilor sau sub formă de lanțuri laterale ^{2,3}. Rata de degradare a substituenților osoși trebuie să aibă loc într-un ritm proporțional cu ritmul de formare a noului țesut, pentru a menține stabilitatea sistemului os-scaffold și a permite creșterea osoasă. O rată de degradare prea rapidă poate duce la colapsul structurii poroase, împiedicând astfel transferul de masă și provocând necroza țesuturilor. În contrast, o degradare prea lentă, poate face regenerare osoasă dificilă din cauza formării de capsule fibroase și a lipsei integrării scheletului în țesutul gazdă ^{4,5}. De asemenea, gradul de gonflare al materialului nu influențează doar dimensiunile finale ale structurii, ci și proprietățile mecanice și stabilitatea structurală. Astfel, capacitatea de gonflare trebuie să fie atent reglată

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

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 asigura un echilibru între elasticitate și rezistența mecanică a scaffold-urilor^{6,7}. Prin urmare, obținerea atât a unei cinetici optime de gonflare cât și a unei degradări optime a structurii este importantă pentru promovarea regenerării osoase.

Prezentul studiu se focusează pe analiza comportamentului de gonflare și degradare a probelor pe bază de gelatină metacrilată (GelMA) și gellan metacrilat, ranforsate cu diferite concentrații de oxid de grafenă (GO) – 0%, 0.125%, 0.25% și 0.5%. Sinteza formulărilor, printarea 3D și liofilizarea structurilor au fost descrise într-un raport anterior.

I.1.1.2. Cinetica de gonflare a structurilor de regenerare osoasă

Analiza cineticii de gonflare s-a realizat prin cântărirea structurilor printate 3D și liofilizate (W_0), urmată de imersarea lor în soluție tampon salină (PBS), la pH 7.4 și temperatura de 37°C pentru a simula condițiile fiziologice. La diferite intervale de timp, structurilor au fost extrase, iar după îndepărtarea excesului de lichid acestea au fost cântărite (W_i) pentru a determina gradul de gonflare prin aplicarea ecuației (1):

$$\text{Gradul de gonflare (\%)} = \frac{W_i - W_0}{W_0} \times 100 \quad (1)$$

S-au analizat câte 3 probe din fiecare structură pentru a obține rezultate relevante și reproductibile. Tabelul 1 indică masa (mg) a probelor înregistrată de la timpul inițial și până la 1440 de minute (24 de 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

Tabelul 1. Masa probelor (mg) în timpul studiilor de gonflare, la diferite intervale de timp

Timp (min)	Masa probelor (mg)											
	GG (control)			GG-12GO			GG-25GO			GG-50GO		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0	14.3	25.2	13.3	28.7	25.3	29.5	36.1	43.3	32.3	30.8	42.9	43.9
1	22.3	30.7	27.8	40.7	43.1	45.5	57.8	76.7	47.6	42.3	70.7	66.9
15	55.8	78.1	74.9	115.1	102.8	106.2	127.9	163.3	115.6	103	138	159.3
30	65	93.4	86.6	119.9	118.5	125.4	147.9	170.3	125.2	118.6	160.3	183.2
45	68.4	103.1	93.7	126.3	130.8	131.6	149.7	179.1	132.3	122.4	157.9	183.7
60	72.7	110.3	100.2	131.7	136.3	137.5	148.9	184	136.3	122.4	168.1	186.1
90	75.8	117.1	103.1	138.2	136.8	143.8	152.2	188.2	137.7	130.6	170.5	205.4
120	77.4	121.3	107.5	141.3	137.7	155.4	159.2	193.8	142.8	126.4	173	192.7
180	82.4	124.1	109.4	146.5	140	148.4	156.2	193.2	142.1	124.6	179.1	195.4
240	80.7	125.5	108.1	151.5	143.3	154.2	160.5	194.6	144.5	131.1	178.9	195.5
300	83.7	125.9	111.3	149.9	144.3	155.8	160.5	195.5	142.7	129.9	179	200.4
360	82.7	128.3	113.6	149.7	143.4	158.2	161.6	198.7	147.8	130.1	185.8	196.8
420	82.9	131	114	153.5	149.1	159.5	162.7	203.4	144.7	129.7	180.9	201.3
1440	89	133.3	120.7	158.8	151.3	157	164.2	201.7	140.5	130	183.4	196.1

Tabelul 2 prezintă gradul de gonflare după aplicarea ecuației 1, pentru fiecare proba analizată. Se poate observa o variație a valorilor în funcție de conținutul de GO utilizat pentru ranforsarea structurilor.

Tabelul 2. Gradul de gonflare al probelor (%) la diferite intervale de timp

Timp (min)	Gradul de gonflare (%)											
	GG (control)			GG-12GO			GG-25GO			GG-50GO		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	55.94406	21.8254	109.0226	41.81185	70.35573	54.23729	60.1108	77.13626	47.36842	37.33766	64.80186	52.3918
15	290.2098	209.9206	463.1579	301.0453	306.3241	260	254.2936	277.1363	257.8947	234.4156	221.6783	262.8702
30	354.5455	270.6349	551.1278	317.77	368.3794	325.0847	309.6953	293.3025	287.6161	285.0649	273.6597	317.3121
45	378.3217	309.127	604.5113	340.0697	416.996	346.1017	314.6814	313.6259	309.5975	297.4026	268.0653	318.451
60	408.3916	337.6984	653.3835	358.885	438.7352	366.1017	312.4654	324.9423	321.9814	297.4026	291.8415	323.918
90	430.0699	364.6825	675.188	381.5331	440.7115	387.4576	321.6066	334.642	326.3158	324.026	297.4359	367.8815
120	441.2587	381.3492	708.2707	392.3345	444.2688	426.7797	340.9972	347.5751	342.1053	310.3896	303.2634	338.9522
180	476.2238	392.4603	722.5564	410.453	453.3597	403.0508	332.687	346.1894	339.9381	304.5455	317.4825	345.1025
240	464.3357	398.0159	712.782	427.8746	466.4032	422.7119	344.5983	349.4226	347.3684	325.6494	317.0163	345.3303
300	485.3147	399.6032	736.8421	422.2997	470.3557	428.1356	344.5983	351.5012	341.7957	321.7532	317.2494	356.492
360	478.3217	409.127	754.1353	421.6028	466.7984	436.2712	347.6454	358.8915	357.5851	322.4026	333.1002	348.2916
420	479.7203	419.8413	757.1429	434.8432	489.3281	440.678	350.6925	369.746	347.9876	321.1039	321.6783	358.5421
1440	522.3776	428.9683	807.5188	453.3101	498.0237	432.2034	354.8476	365.8199	334.9845	322.0779	327.5058	346.697

În tabelul 3 este indicată media aritmetică obținută pe baza celor 3 valori ale gradului de gonflare pentru fiecare probă, înregistrat la diferite intervalele de timp.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

Tabelul 3. Gradul de gonflare exprimat ca medie aritmetică între cele 3 valori obținute pentru fiecare probă

Gradul de gonflare %				
Timp (min)	GG (control)	GG-12GO	GG-25GO	GG-50GO
0	0	0	0	0
1	62.264	55.46829	61.53849	51.51044
15	321.0961	289.1231	263.1082	239.6547
30	392.1027	337.0781	296.8713	292.0122
45	430.6533	367.7225	312.6349	294.6396
60	466.4912	387.9073	319.7964	304.3874
90	489.9801	403.2341	327.5215	329.7811
120	510.2929	421.1276	343.5592	317.5351
180	530.4135	422.2878	339.6048	322.3768
240	525.0445	438.9965	347.1298	329.332
300	540.5867	440.2637	345.9651	331.8316
360	547.1947	441.5575	354.7073	334.5981
420	552.2348	454.9497	356.142	333.7748
1440	586.2882	461.1791	351.884	332.0936

Pentru obținerea unor rezultate relevante a fost calculată și deviația standard (STDEV), prezentată în tabelul 4.

Tabelul 4. Deviația standard calculată pentru cele 3 valori obținute pentru fiecare probă

STDEV %				
Timp (min)	GG (control)	GG-12GO	GG-25GO	GG-50GO
0	0	0	0	0
1	43.94078	14.3117	14.93519	13.7533
15	129.4131	25.35911	12.28135	21.08976
30	143.9687	27.35339	11.46406	22.64027
45	154.4892	42.77861	2.682909	25.30626
60	165.6681	44.16588	6.519133	17.14105
90	163.6928	32.59128	6.600803	35.57371
120	174.0508	26.42445	3.5217	18.8869
180	171.5904	27.16234	6.757364	20.71676
240	165.9325	23.8748	2.420984	14.51178
300	175.282	26.22335	4.995004	21.47498
360	182.5248	23.05688	6.150574	13.00932
420	179.9635	29.91509	11.85872	21.45108
1440	197.2018	33.60832	15.62984	12.93487

Figura 1 ilustrează cinetica de gonflare a fiecărei probe de la timpul inițial până la 1440 de minute (24 h). Se observă efectul semnificativ al ranforsării cu GO asupra capacității structurilor de gonflare. Proba control, GG, prezintă un grad de gonflare mai pronunțat și variații semnificative între cele 3 probe înregistrate. Odată cu creșterea concentrației de GO

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

utilizate se observă o scădere a gradului de gonflare și o stabilizare a deviației standard. Probele ranforsate cu 0.25% și 0.50% GO prezintă valori similare, indicând cele mai scăzute gonflări și cele mai mici deviații standard, astfel prezentând relevanță și reproductibilitate. Aceste rezultate sugerează că inducerea GO determină formarea unor structuri mai stabile, care limitează absorbția de lichid, iar modificarea concentrației de GO poate avea rol în reglarea gradului de gonflare al structurilor pentru regenerare osoasă.

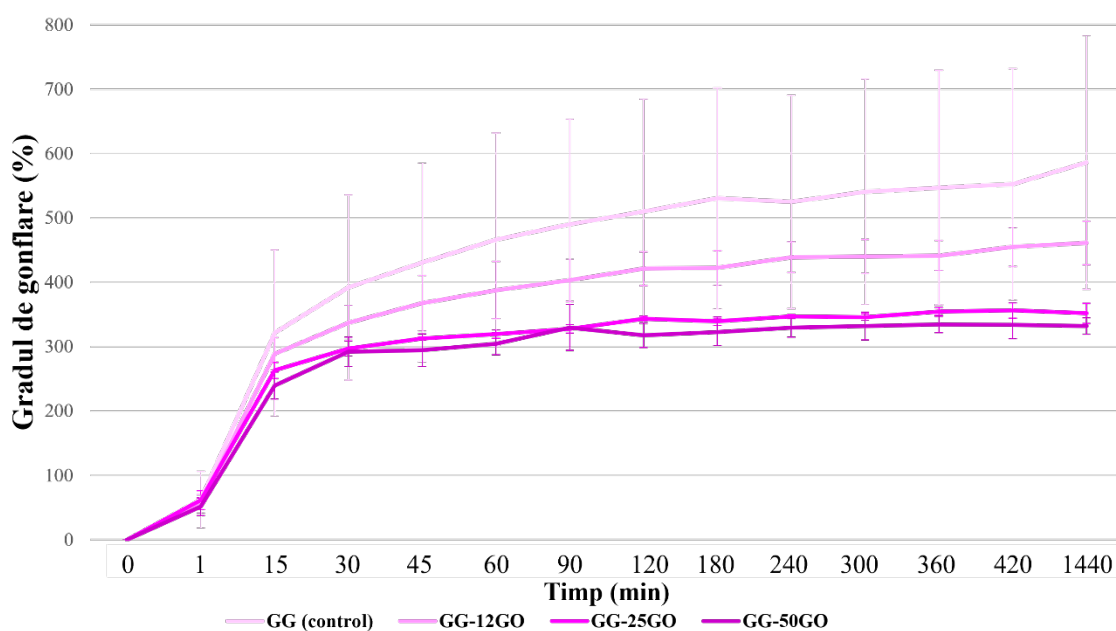


Figura 1. Cinetica de gonflare a probelor din GelMA, gellan metacrilat și GO în concentrații de 0%, 0.125%, 0.25% și 0.5%.

I.1.1.3. Degradarea structurilor de regenerare osoasă

Pentru evaluarea comportamentului de degradare, scaffold-urile obținute prin printare 3D și ulterior liofilizate au fost cântărite inițial (W), apoi incubate în PBS (pH 7.4) la 37 °C pentru perioade de 7, 14 și 21 zile. La intervalele stabilite, probele au fost extrase, clătite cu apă deionizată pentru îndepărtarea sărurilor reziduale, uscate la 37°C și cântărite din nou (W_i). Stabilitatea probelor a fost determinată prin calcularea masei rămase folosind ecuația (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

exprimată ca procent din greutatea inițială. Această metodă permite o apreciere cantitativă a stabilității structurale în mediu fiziologic simulat.

$$\text{Masa rămasă (\%)} = \frac{W_i}{W} \times 100 \quad (2)$$

S-au analizat câte 3 probe din fiecare structură pentru a obține rezultate relevante și reproductibile. Tabelul 5 indică masa (mg) a probelor înregistrată inițial, la 7, 14 și 21 de zile.

Tabelul 5. Masa probelor (mg) în timpul studiilor de stabilitate, la 7, 14 și 21 de zile.

Timp (zile)	Masa probelor (mg)											
	GG (control)			GG-12GO			GG-25GO			GG-50GO		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0	110.2	40.7	36.5	113.6	35.8	56.2	75.6	18.9	144.8	36.4	80	43
7	95.4	38.4	26.1	113.5	35.8	56.1	75.6	18.9	144.6	16.7	20.6	23.1
14	44.7	33.5	8.7	111.1	35.8	56	71.2	18.3	142.4	10.9	18.2	7.9
21	24.2	19	8.4	111.1	35.8	55.9	69.7	17.9	141.3	10.7	0	0

De asemenea, la 14 zile s-au obținut imagini ale probelor în soluția PBS, înainte ca acestea să fie uscate și cântărite. În figura 1.1.2 se poate observa stabilitatea acestor probe. Proba control, GG, nu este vizibilă deoarece din aceasta s-a eliberat o cantitate semnificativă de genipin, în ciuda faptului că toate probele au fost spălate cu apă ultrapură după reticulare. Probele cu diferite concentrații de GO nu au eliberat genipin, însă se poate observa o schimbare de culoare care poate fi asociată cu eliberarea unei cantități de GO în mediu. Proba GG-50 pare să prezinte rezultatele cele mai slabe privind stabilitatea, iar aceste date ne arată că utilizarea unei concentrații de 0.5% GO în formularea printabilă afectează negativ stabilitatea structurilor printate.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

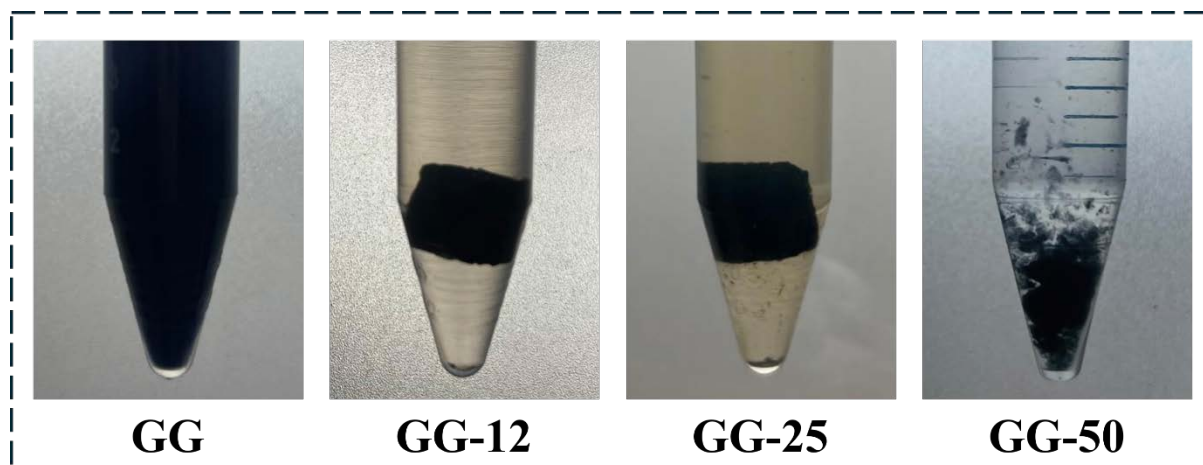


Figura 2. Imagini ale structurilor în mediul de degradare după 14 zile de incubare în condiții fiziologice

Tabelul 6 ilustrează stabilitatea raportată procentual la intervalele de timp menționate. Probele fără GO par să prezinte o scădere semnificativă de masă, cu variații mari între probe. Rezultate mai stabile s-au înregistrat pentru probele cu 0.125% și 25% GO, variațiile fiind mai mici în cazul probelor GG-12GO. În cazul probelor GG-50GO s-a înregistrat o degradare semnificativă, cu variații mai între probe.

Tabelul 6. Masa rămasă (%) după 7, 14 și 21 de zile de degradare

Timp (zile)	Masa rămasă (%)											
	GG (control)			GG-12GO			GG-25GO			GG-50GO		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
7	86.56987	94.34889	71.50685	99.91197	100	99.82206	100	100	99.86188	45.87912	25.75	53.72093
14	40.56261	82.30958	23.83562	97.7993	100	99.64413	94.17989	96.8254	98.34254	29.94505	22.75	18.37209
21	21.96007	46.68305	23.0137	97.7993	100	99.46619	92.19577	94.70899	97.58287	29.3956	0	0

În tabelul 7 este indicată media aritmetică obținută pe baza celor 3 valori în timpul studiilor de stabilitate pentru fiecare probă (AV), alături de deviația standard (DEV) și valoarea P.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

Tabelul 7. Masa rămasă (%) exprimată ca medie aritmetică între cele 3 valori obținute pentru fiecare probă.

Studiile de stabilitate												
Timp (zile)	GG (control)			GG-12GO			GG-25GO			GG-50GO		
	AV (%)	DEV (%)	P	AV (%)	DEV (%)	P	AV (%)	DEV (%)	P	AV (%)	DEV (%)	P
0	100	0	1	100	0	0.864578	100	0	0.711453	100	0	0.751215
7	84.14187	11.61297	1	99.91135	0.08897	0.656086	99.95396	0.079745	0.565063	41.78335	14.42826	0.196587
14	48.9026	30.11591	1	99.14781	1.181323	0.195256	96.44928	2.106658	0.266868	23.68905	5.843349	0.207293
21	30.55227	13.97959	1	99.0885	1.14794	0.093414	94.82921	2.695564	0.176719	9.798535	16.97156	0.080544

Rezultatele ilustrate în figura 3 oferă informații privind rolul GO în stabilitatea structurilor printate 3D. Probele GG, conținând doar GelMA și gellan metacrilat, au prezentat o scădere de masă semnificativă din primele 7 zile, iar după 21 de zile doar $30.5 \pm 13.9\%$ din masa inițială s-a menținut. În contrast, probele GG-12GO au înregistrat cea mai ridicată stabilitate, masa rămasă după 21 de zile fiind de $99.0 \pm 1.1\%$. Rezultate bune au înregistrat și probele GG-25GO, cu o masă finală de $94.8 \pm 2.6\%$, în timp de probele cu 0.5% GO, GG-50GO, au înregistrat cele mai semnificative pierderi, cu două dintre probe complet distruse până în ziua 21. Mai mult, probele GG și GG50GO au prezentat și diferențe semnificative între probe, indicând astfel că rezultatele lor nu sunt reproductibile. Aceste date ne indică faptul că cinetica de degradare a probelor poate fi controlată prin utilizarea unor concentrații de GO cuprinse între 0.125 și 0.25%.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

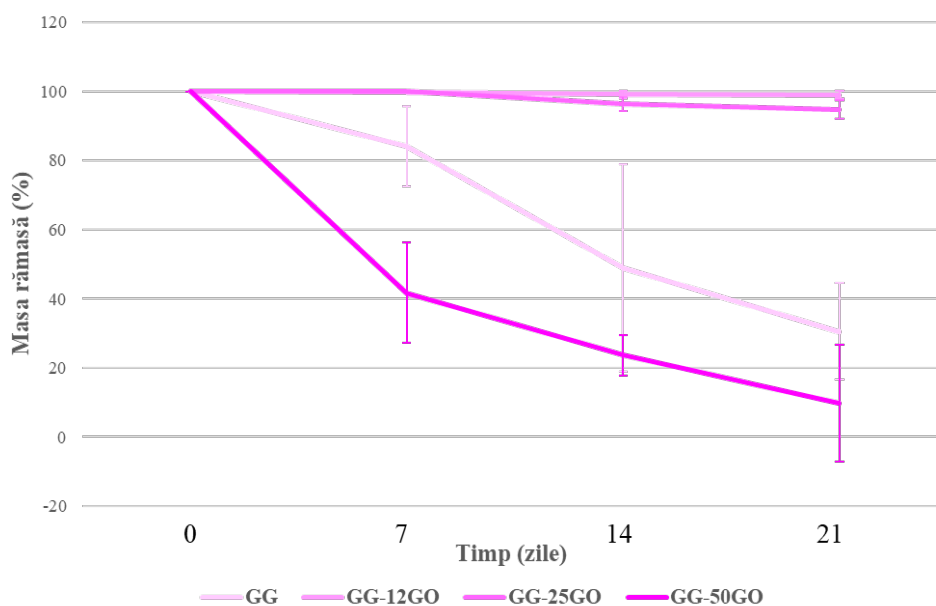


Figura 3. Stabilitatea probelor din GelMA, gellan metacrilat și GO în concentrații de 0%, 0.125%, 0.25% și 0.5%, la 7, 14 și 21 de zile.

I.1.1.4. Concluzii

Rezultatele obținute evidențiază rolul GO atât în comportamentul de gonflare al probelor printate 3D, cât și în stabilitatea acestora. Probele ranforsate cu GO au prezentat o reducere semnificativă a gradului de gonflare comparativ cu proba control, în special la concentrații de 0.25% și 0.50%, unde s-au observat cele mai scăzute valori și cele mai mici deviații standard, indicând astfel o reproductibilitate ridicată. În ceea ce privește degradarea, probele GG-12GO și GG-25GO au demonstrat o stabilitate crescută după 21 de zile, spre deosebire de proba control (GG) și GG-50GO, care au suferit degradări semnificative și variabilitate între probe. Aceste observații sugerează că integrarea GO în concentrații moderate (0.125–0.25%) conferă scaffold-urilor o rețea mai stabilă, capabilă să limiteze absorbția de lichid și degradarea în medii fiziologice. Astfel, concentrația de GO poate fi utilizată ca

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

parametru de reglare a proprietăților fizico-chimice ale structurilor 3D pentru aplicații în ingineria țesutului osos.

I.1.1.5. Bibliografie

1. Agrawal CM, McKinney JS, Lanctot D, Athanasiou KA. Effects of fluid flow on the in vitro degradation kinetics of biodegradable scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*. 2000;21(23):2443-2452. doi:10.1016/S0142-9612(00)00112-5
2. Mendonça RH, de Oliveira Meiga T, da Costa MF, da Silva Moreira Thiré RM. Production of 3D scaffolds applied to tissue engineering using chitosan swelling as a porogenic agent. *J Appl Polym Sci*. 2013;129(2):614-625. doi:10.1002/app.38735
3. Cheung HY, Lau KT, Lu TP, Hui D. A critical review on polymer-based bio-engineered materials for scaffold development. *Compos B Eng*. 2007;38(3):291-300. doi:10.1016/j.compositesb.2006.06.014
4. Tajvar S, Hadjizadeh A, Samandari SS. Scaffold degradation in bone tissue engineering: An overview. *Int Biodeterior Biodegradation*. 2023;180:105599. doi:10.1016/j.ibiod.2023.105599
5. Zhang H, Zhou L, Zhang W. Control of Scaffold Degradation in Tissue Engineering: A Review. *Tissue Eng Part B Rev*. 2014;20(5):492-502. doi:10.1089/ten.teb.2013.0452
6. Zhu J, Marchant RE. Design properties of hydrogel tissue-engineering scaffolds. *Expert Rev Med Devices*. 2011;8(5):607-626. doi:10.1586/erd.11.27
7. Drury JL, Mooney DJ. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials*. 2003;24(24):4337-4351. doi:10.1016/S0142-9612(03)00340-5

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

I.1.2. Protocol pentru printare 3D și funcționalizare a scaffoldurilor pe bază de gelatină, nanofibre de celuloză, K-carrageenan și oxid de grafenă carboxilat cu oligonucleotide antisens pentru mielom multiplu

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

Subactivitatea 1.6. Încorporarea conjugatelor de tip GO-ASO în materialul de printare.

I.1.2.1. Introducere

În cadrul cercetărilor actuale în domeniul regenerării osoase și tratamentului complicațiilor asociate cu mielomul multiplu, știința materialelor biocompatibile și tehnologiile avansate de printare 3D joacă un rol esențial. Proiectul Advanced & Personalized Solutions for Bone Regeneration and Complications Associated with Multiple Myeloma (REOSTOMI) vizează dezvoltarea unor soluții inovative pentru regenerarea osoasă, folosind scaffolduri personalizate care combină biocompatibilitatea și stimularea proceselor de vindecare în cadrul mielomului multiplu.

Studiile de literatură sugerează că scaffoldurile pe bază de gelatină (G), K-Carragenan (K), nanofibre de celuloză (CNF) și grafenă-carboxilată (GO-COOH) pot oferi un cadru excelent pentru creșterea celulară și regenerarea țesuturilor osoase, având totodată și proprietăți de susținere a interacțiunilor celulare și protecție împotriva tumorilor. Utilizarea printării 3D în fabricarea acestor structuri permite personalizarea acestora în funcție de nevoile pacientului, asigurându-se o mai bună integrare și adaptabilitate la diverse condiții anatomice.

Mai mult decât atât, funcționalizarea scaffoldurilor cu oligonucleotide antisens (ASOs) reprezintă o abordare inovativă în tratamentul mielomului multiplu, prin inhibarea expresiei genelor implicate în progresia bolii. Integrând aceste componente, se poate atinge o dualitate funcțională, în care scaffoldurile nu doar că susțin regenerarea osoasă, dar și contribuie la tratamentele țintite pentru cancer.

În această lucrare, vom analiza cercetările existente referitoare la utilizarea printare 3D pentru fabricarea scaffoldurilor din gelatină, nanofibre de celuloză și grafenă carboxilată,

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

precum și aplicațiile oligonucleotidelor antisens în contextul mielomului multiplu, punând accent pe metodele de îmbunătățire a eficienței și biocompatibilității acestor soluții avansate.

I.1.2.2. Materiale și sinteză

I.1.2.2.1. Materiale utilizate

Gelatina obținută din piele de pește, K-Carragenan, 1-Etil-3-(3-dimethylaminopropil)carbodiimide (EDC), n-hidroxisuccinimide (NHS), GO-COOH, clorură de calciu și genipinul ($\geq 98\%$, pulbere) au fost achiziționate de la Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, SUA). De asemenea alfa mediu modificat de vulture (α -MEM), sodium dodecil sulfat (SDS), albumină serică bovină (BSA), tampon tris-hidroclorid (Tris-HCl, pH 8) și clorura de magneziu ($MgCl_2$)

FAM-ssADN, marcat cu 6-carboxifluoresceină la primerul final și având secvența 5'-TTTCAACATCAGTCTGATAAGCTATCTCCC-3, a fost achiziționat de la Integrated DNA Technologies, Inc. (Coralville, IA, SUA). Nanofibrele de celuloză (CNF) oxidate cu 2,2,6,6-tetrametil-1-piperidinyloxy (TEMPO) au fost achiziționate de la Novarials Co. (Woburn, MA).

I.1.2.2.2. Sinteza

Studii preliminare pentru legarea covalentă a ASO-urilor de nanoplatforme grafenice

Se va pregăti o soluție de GO-COOH în care se vor adăuga 0,2 M EDC și 0,05 M NHS pentru realizarea legării covalente a ssADN-ului. În prima etapă, GO-COOH (1 mg/mL) va fi dispersat prin ultrasonare timp de 120 de minute, la o amplitudine de 25%, utilizând cicluri de 15 secunde de pulsare urmate de 5 secunde de pauză, într-un volum de 10 mL de apă. Prioritar experimentului s-a realizat resuspensia FAM-ssADN prin adăugarea a 1 mL apă ultrapură. Calculele necesare resuspensiei s-au realizat folosind calculatorul online de pe site-ul IDT Technolgy, astfel s-a obținut o concentrație de 32.4 μ M ssADN. Ulterior soluția de GO-COOH se va dilua la o concentrație de 0.5 mg/mL iar în această soluție se va adăuga amestecul EDC-NHS, și apoi o concentrație de 50 nM FAM-ssADN. Pentru a evalua legarea moleculelor FAM-

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

ssADN de suprafața de grafenă, se va măsura intensitatea fluorescenței utilizând fluorimetrul Tecan Spark. Influența fiecărui compus din soluție asupra eficienței legării va fi analizată prin compararea valorilor de fluorescență obținute.

Sinteză scaffolduri

Pentru printare 3D și funcționalizare a scaffoldurilor pe bază de G, K, CNF și GO-COOH cu ASO pentru mielom multiplu, formulările printabile sunt codificate astfel: **GKC**, **GKC-25 GO-COOH**, conform tabelului 8.

Tabelul 8. Concentrațiile utilizate în realizarea formulărilor printabile

COD	G	CNFs	K	GO-COOH	Genipin
GKC	12%	1% (5 mL)	4%	-	1%
GKC- GO-COOH	12%	1% (5 mL)	4%	0.5 mg/mL	1%

Pentru fiecare formulare, GO-COOH a fost dispersat prin ultrasonare timp de 120 de minute, la o amplitudine de 25%, folosind cicluri de 15 secunde de pulsare urmate de 5 secunde de pauză, într-o soluție conținând 10 mL de 1% CNF. Procesul de ultrasonare a contribuit la integrarea omogenă a nanostructurilor în matricea polimerică.

Pentru a facilita dizolvarea gelatinei, baia de apă a fost încălzită până la 70°C. S-au cântărit 1.2 g de gelatină, 0.2 g nanofibre celuloză și 0.4 g de k carragenan, care au fost adăugate în dispersia de CNF-uri cu GO-COOH. Aceste componente de bază au fost incluse în toate formulările pentru a conferi structură și o vâscozitate adecvată, necesară pentru printarea 3D. Pentru proba martor, s-a utilizat același volum de apă, fără dispersia de GO-COOH.

Dizolvarea gelatinei și k-carragenanului s-a realizat treptat, prin adăugarea în porții mici, pe parcursul a 10–15 minute. Omogenizarea completă s-a efectuat timp de 60 de minute, pentru a asigura o dispersie uniformă a tuturor componentelor.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

Printare scaffoldurilor cu formulările obținute

Formulările obținute au fost printate folosind diferite presiuni și viteze de printare. Pentru stabilizarea finală a structurilor, fiecare probă a fost supusă unui proces de reticulare în două etape: inițial, reticulare cu $MgCl_2$ timp de 30 de minute, urmată de imersie într-o soluție de 1% genipin timp de 24 de ore. Probele astfel reticulate au fost apoi înghețate în azot lichid și liofilizate, fiind astfel pregătite pentru caracterizarea proprietăților mecanice și biologice, esențiale în evaluarea eficienței formulărilor în regenerarea osoasă.

Analize necesare pentru evaluarea scaffoldurilor

Pentru a evalua performanța scaffoldurilor dezvoltate în contextul regenerării osoase și livrării controlate de oligonucleotide antisens (ASO), trebuie realizate o serie de analize fizico-chimice și morfologice, menite să evidențieze proprietățile cheie ale materialului:

- *Proprietăți mecanice:* Se vor realiza teste de compresie, tracțiune și/sau forfecare, care vor permite determinarea modului elastic și a rezistenței mecanice a scaffoldurilor, proprietăți esențiale pentru menținerea integrității structurale în aplicații tisulare.
- *Stabilitate:* Pentru a determina rata de degradare și capacitatea scaffoldurilor de a-și păstra structura în timp se vor realiza teste de stabilitate în apă sau pbs.
- *Gonflare:* Prin măsurarea absorbției de lichid, se evaluează capacitatea scaffoldului de a facilita difuzia nutrienților și eliberarea substanțelor active.
- *Reologie:* Comportamentul viscoelastic al gelurilor înainte de reticulare este analizat pentru a determina printabilitatea și proprietățile de curgere, folosind parametri precum modulul elastic (G') și vâscozitatea în funcție de turație.
- *Morfologie:* Structura poroasă și arhitectura internă sunt investigate prin microscopie electronică de baleiaj (SEM), oferind informații despre dimensiunea și distribuția porilor, aspecte critice pentru integrarea celulară și transportul de substanțe.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

- *Structură chimică:* Tehnicile spectroscopice (FTIR, Raman) și difracția de raze X (XRD) permit identificarea componentelor chimice, a interacțiunilor moleculare și a gradului de cristalinitate. -Posibil analizele termice (DSC/TGA) pentru caracterizarea stabilității termice și a comportamentului de degradare.

Încărcarea platformelor GO-COOH cu ASO

Pentru funcționalizarea platformelor cu capacitate terapeutică specifică, s-au adsorbit ASO specifice pentru MM. Platformele GO-COOH au fost imersate într-o soluție apoasă de ASO-uri cu o concentrație de 50 nM. În această soluție se regăsesc componente precum α-MEM, SDS, BSA, Tris-HCl la pH 6, MgCl₂, EDC-NHS iar pentru prepararea a 100 μl per godeu se vor respecta concentrațiile indicate în tabelul 9 de mai jos.

Tabel 9. Cantitățile și concentrațiile ce se vor utiliza pentru incubarea scaffoldurilor

COD	GO-COOH	BSA (0.1 mg/mL)	FAM-ADN (20 nM)	SDS (0.1%)	MgCl ₂ (100 mM)	TrisHCl pH 6 (10 mM)
Soluție incubare (μl)	45	2	5	2	30	16

Incubarea va avea loc la temperatura camerei, timp de 24 ore, pentru a permite o adsorbție eficientă și pentru a evita degradarea termică a oligonucleotidelor.

Pentru control și evaluarea capacității maxime de adsorbție a scaffoldurilor, se va analiza o soluție standard de ASO-uri (50 nM în apă) prin spectrofluorimetrie, utilizând echipamentul Tecan Spark. Astfel pentru a observa dacă există posibilitatea de detasare a ASO-urilor masa totală desorbită de ASO-uri se va calcula folosind formula:

$$M_f = \frac{F_f * M_i}{F_i} \quad (1)$$

unde:

- F_i reprezintă fluorescența inițială a secvenței FAM-ssDNA în soluția de adsorbție (aproximativ 3800 r.f.u.),

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

- M_i este masa inițială de FAM-ssDNA în soluția de adsorbție (aproximativ 4420 pg), calculată utilizând instrumentul „DNA Molecular Weight and Conversion” de la Thermo Fisher [74],
- F_f este fluorescența finală (după desorbție),
- M_f este masa finală a FAM-ssDNA eliberată, exprimată în pg.

Această formulă permite transformarea valorii fluorescenței în unități de masă.

După determinarea masei totale de ASO-uri la concentrația de 50 nM, se va calcula masa de ASO-uri posibil adsorbită de platformele GO-COOH, pe baza rezultatelor obținute. În prealabil, se vor efectua teste de rutină pentru a verifica dacă componentele din soluția platformelor pot interfera cu soluțiile fără ASO-uri, în vederea obținerii unui semnal de fluorescență cât mai curat. După finalizarea analizelor privind capacitatea de adsorbție și profilul de eliberare în condiții controlate, următorul pas va consta în mixarea platformelor cu ASO-urilor cu hidrogeluri printabile 3D.

I.1.2.3. Concluzii

În contextul nevoilor tot mai mari pentru terapii personalizate în oncologie și medicina regenerativă, proiectul REOSTOMI își propune să investigheze potențialul unor scaffolduri pe bază de gelatină, K-Caragenan, nanofibre de celuloză și GO-COOH realizate prin tehnologii avansate de printare 3D. Aceste structuri ar putea servi drept suport pentru regenerarea osoasă, fiind în același timp funcționalizate cu oligonucleotide antisens (ASO), cu scopul de a modula expresia genelor implicate în progresia mielomului multiplu.

În această etapă, sunt în curs de dezvoltare diverse formulări printabile, urmând ca acestea să fie caracterizate printr-o serie de analize fizico-chimice și structurale. Printre acestea se numără evaluarea proprietăților mecanice, a stabilității în medii apoase, analiza morfologiei prin microscopie electronică (SEM), precum și testarea compoziției chimice prin spectroscopie FTIR/Raman și difracție de raze 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

I.2. CAPITOL 2

I.2.1. Studiarea stabilității scaffoldurilor printate pe bază de gumă gellan și nanofibrile de celuloză ranforsate cu nanofibre electrofilate de chitosan/polietilenoxid

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

I.2.1.1. Introducere

Regenerarea osoasă reprezintă un domeniu esențial al medicinei regenerative, vizând restaurarea țesuturilor afectate de traumatisme, intervenții chirurgicale, boli degenerative sau maligne. În cazul defectelor de dimensiuni mari sau dificil de vindecat spontan, utilizarea scaffoldurilor bioactive devine indispensabilă, oferind un suport tridimensional temporar care ghidează proliferarea, migrarea și diferențierea celulelor în vederea formării unui nou țesut funcțional.

Evaluarea comportamentului *in vitro* al scaffoldurilor destinate regenerării osoase reprezintă un pas esențial în dezvoltarea unor soluții eficiente, sigure și predictibile pentru aplicarea clinică. Întrucât integrarea acestor structuri în țesutul gazdă implică o interacțiune complexă cu mediul biologic, este important ca materialele utilizate să îndeplinească cerințe riguroase privind stabilitatea structurală, capacitatea de absorbție a fluidelor și rata de degradare controlată.

Printarea 3D a scaffoldurilor biocompatibile pe bază de polizaharide naturale, precum guma gellan (GG) și nanofibrile de celuloză (CNF), oferă un cadru versatil pentru imitarea arhitecturii osoase și susținerea regenerării tisulare. Prin încorporarea de nanofibre electrofilate de chitosan/polietilenoxid (NFs), se urmărește îmbunătățirea performanței funcționale a acestor structuri, însă impactul acestor adaosuri asupra stabilității pe termen lung necesită o caracterizare detaliată.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

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 studiu a fost continuat experimentul de evaluare a stabilității scaffoldurilor printate 3D pe bază de gumă gellan (G), nanofibrile de celuloză (C) și diferite concentrații (0,5%, 1%, 2% și 4%) de nanofibre electrofilate de chitosan/polietilenoxid (NFs), notate GC31 (control), GCN-0.5%, GCN-1%, GCN-2%, respectiv GCN-4%. Obiectivul principal a fost de a identifica formulările care mențin un echilibru optim între stabilitatea structurală și potențialul de degradare controlată, relevante pentru aplicații în regenerarea țesutului osos.

I.2.1.2. Materiale și metode

Scaffoldurile fabricate prin printare 3D, realizate dintr-o rețea polimerică formată din GG și CNF într-un raport de 3/1 (m/m), au fost funcționalizate prin încorporarea de NFs în concentrații variabile: 0.5%, 1%, 2% și 4% (raportat la masa totală a compozitului). Probele astfel obținute au fost liofilizate în vederea evaluării stabilității în mediu apos.

În vederea evaluării stabilității structurilor printate, câte 3 probe din fiecare compoziție (GC31 cu adaos de 0 - 4% chitosan) au fost cântărite inițial (W_0) cu ajutorul unei balanțe analitice. Inițial, probele au fost imersate în apă ultrapură și incubate la 37°C într-o etuvă de laborator, timp de 24 ore, iar în studiul actual (continuat), probele au fost incubate timp de 7 zile. În continuare, scaffoldurile au fost uscate la 37°C timp de două ore și cântărite din nou. Greutatea rămasă a probelor a fost calculată în conformitate cu ecuația (I):

$$\text{Masa rămasă (\%)} = W/W_0 \times 100 \quad (I)$$

Toate rezultatele au fost obținute în triplicat și au fost exprimate ca medie a acestor valori. Astfel, datele au fost exprimate ca $\pm$ STDEV (abatere standard), iar evaluarea statistică a fost efectuată utilizând funcția Student t-test.

I.2.1.3. Rezultate și discuții

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

Studii de stabilitate in vitro a structurilor printate 3D

Pentru a evalua comportamentul scaffoldurilor în mediu apos pe termen lung, a fost monitorizată degradarea formulărilor GC31 (martor) și GCN-x% (0.5%, 1%, 2% și 4% NFs) pe o perioadă de 82 de zile. Analiza s-a bazat pe măsurători periodice și pe interpretarea datelor statistice obținute din datele experimentale și figura 4.

Tabelul 10 prezintă valorile individuale ale masei probelor (exprimată în miligrame) la fiecare punct de timp, încă de la început fiind observată o diferențiere clară între compoziții. GCN-4% prezintă o pierdere accelerată a masei, depășind pragul de 50%, indicând o structură mai puțin stabilă. Pe de altă parte, după prima săptămână, GCN-2% își păstrează o masă constantă, în jurul valorii de 7 mg, pe întreaga perioadă rămasă, demonstrând o stabilitate structurală superioară. De asemenea, formulările GCN-0.5% și GCN-1% prezintă o degradare lentă, cu variații mici în masa probelor, sugerând o rețea polimerică relativ stabilă.

Tabelul 10. Masa probelor exprimată în miligrame (mg)

Nr.	Proba	m0 [mg]	m1 [mg]	m2 [mg]	m3 [mg]	m4 [mg]	m5 [mg]	m6 [mg]	m7 [mg]	m8 [mg]	m9 [mg]	m10 [mg]	m11 [mg]	m12 [mg]	m13 [mg]	m14 [mg]	m15 [mg]	m16 [mg]
1	GC31	9.5	6.4	6.4	6.4	6.3	6.3	6.3	6.2	6.2	6.1	6.1	6	5.9	5.8	5.8	5.7	5.6
2	GC31	8.5	5.4	5.4	5.3	5.3	5.2	5.1	5.1	5	5	5	5	5	4.9	4.9	4.9	4.9
3	GC31	5.2	3.2	3.2	3.1	3.1	3	3	2.9	2.9	2.8	2.8	2.5	2.3	2	1.5	1	0
1	GCN-0.5%	6.7	6.2	6	6	5.9	5.9	5.8	5.8	5.8	5.8	5.7	5.7	5.7	5.6	5.6	5.6	4.9
2	GCN-0.5%	7.8	7.1	7.1	6.9	6.4	6.4	6.3	6.3	6.3	6.3	6.3	6.3	6.2	5.4	5.3	5.3	5.3
3	GCN-0.5%	6.5	5.9	5.9	5.8	5.4	5.4	5.3	5.3	5.3	5.3	5.1	5.1	5	4.8	4.8	4.8	4.8
1	GCN-1%	6.9	4	4	4	4	4	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	3.8	3.7	3.7	3.7
2	GCN-1%	9.2	5.9	5.9	5.7	5.6	5.6	5.6	5.6	5.6	5.6	5.6	5.6	5.6	5.4	5.4	5.4	5.4
3	GCN-1%	9.9	5.4	5.3	5.1	5.1	5.1	5	5	5	5	5	5	5	4.9	4.9	4.9	4.9
1	GCN-2%	8.4	7.9	7.4	7.2	7.1	7.1	7.1	7.1	7.1	7.1	7.1	7.1	7.1	7	7	7	7
2	GCN-2%	8	7.7	7.7	7.5	7.5	7.5	7.5	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.3	7.3	7.3	7.3
3	GCN-2%	7.1	6.4	6.4	6.3	6.2	6.2	6.2	6.1	6.1	6.1	6.1	6.1	6.1	5.9	5.9	5.9	5.9
1	GCN-4%	8.3	4.8	4	3.7	3.5	3.5	3.1	3.1	3.1	3.1	2.7	2	1.3	1.8	0.7	1	0.8
2	GCN-4%	8.7	4.5	4.3	3.8	3.8	3.7	3.6	3.6	3.6	3.5	3	3	3	2.8	2.9	2.9	2.9
3	GCN-4%	10.5	5.5	5.4	4.6	4.4	4.4	4.4	4.4	4.4	4.4	4.4	4.3	4.3	4.2	4.2	4.2	4.2

Tabelul 11, care exprimă masa rămasă ca procent din masa inițială, oferă o imagine comparativă mai clară. După prima săptămână, probele GC31 și GCN-4% încep să piardă masă într-un ritm semnificativ mai rapid față de celelalte formulări, GC31 scăzând progresiv până la o medie de aproximativ 38.8% la ziua 82, în timp ce GCN-4% ajunge la doar 26.7%, indicând o degradare accelerată și instabilitate ridicată. În schimb, GCN-2% rămâne constant peste 87% din masa inițială, inclusiv la finalul testului, confirmând rezistența sa la mediu apos.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

Formulările GCN-0.5% și GCN-1% își păstrează între 71–64% din masa inițială până la sfârșitul perioadei de incubare, ceea ce reflectă o degradare moderată și predictibilă.

Tabelul 11. Masa rămasă a probelor exprimată procentual (%)

		0 zile	1 zi	2 zile	3 zile	4 zile	5 zile	12 zile	19 zile	26 zile	33 zile	40 zile	47 zile	54 zile	61 zile	68 zile	75 zile	82 zile
Nr.	Proba	p0	p1 [%]	p2 [%]	p3 [%]	p4 [%]	p5 [%]	p6 [%]	p7 [%]	p8 [%]	p9 [%]	p10 [%]	p11 [%]	p12 [%]	p13 [%]	p14 [%]	p15 [%]	p16 [%]
1	GC31	100	67.368421	67.3684	67.3684	66.3158	66.3158	66.3158	65.2632	65.2632	64.2105	64.2105	63.1579	62.1053	61.0526	61.0526	60	58.9474
2	GC31	100	63.529412	63.5294	62.3529	62.3529	61.1765	60	58.8235	58.8235	58.8235	58.8235	58.8235	58.8235	57.6471	57.6471	57.6471	57.6471
3	GC31	100	61.538462	61.5385	59.6154	59.6154	57.6923	57.6923	55.7692	55.7692	53.8462	53.8462	48.0769	44.2308	38.4615	28.8462	19.2308	0
1	GCN-0.5%	100	92.537313	89.5522	89.5522	88.0597	88.0597	86.5672	86.5672	86.5672	86.5672	85.0746	85.0746	85.0746	83.5821	83.5821	83.5821	73.1343
2	GCN-0.5%	100	91.025641	91.0256	88.4615	82.0513	82.0513	80.7692	80.7692	80.7692	80.7692	80.7692	80.7692	79.4872	69.2308	67.9487	67.9487	67.9487
3	GCN-0.5%	100	90.769231	90.7692	89.2308	83.0769	83.0769	81.5385	81.5385	81.5385	81.5385	78.4615	78.4615	76.9231	73.8462	73.8462	73.8462	73.8462
1	GCN-1%	100	57.971014	57.971	57.971	57.971	57.971	56.5217	56.5217	56.5217	56.5217	56.5217	56.5217	56.5217	55.0725	53.6232	53.6232	53.6232
2	GCN-1%	100	64.130435	64.1304	61.9565	60.8696	60.8696	60.8696	60.8696	60.8696	60.8696	60.8696	60.8696	60.8696	58.6957	58.6957	58.6957	58.6957
3	GCN-1%	100	54.545455	53.5354	51.5152	51.5152	51.5152	50.5051	50.5051	50.5051	50.5051	50.5051	50.5051	50.5051	49.4949	49.4949	49.4949	49.4949
1	GCN-2%	100	94.047619	88.0952	85.7143	84.5238	84.5238	84.5238	84.5238	84.5238	84.5238	84.5238	84.5238	84.5238	83.3333	83.3333	83.3333	83.3333
2	GCN-2%	100	96.25	96.25	93.75	93.75	93.75	93.75	92.5	92.5	92.5	92.5	92.5	92.5	91.25	91.25	91.25	91.25
3	GCN-2%	100	90.140845	90.1408	88.7324	87.3239	87.3239	87.3239	85.9155	85.9155	85.9155	85.9155	85.9155	85.9155	83.0986	83.0986	83.0986	83.0986
1	GCN-4%	100	57.831325	48.1928	44.5783	42.1687	42.1687	37.3494	37.3494	37.3494	37.3494	32.5301	24.0964	15.6627	21.6867	8.43373	12.0482	9.63855
2	GCN-4%	100	51.724138	49.4253	43.6782	43.6782	42.5287	41.3793	41.3793	41.3793	40.2299	34.4828	34.4828	34.4828	32.1839	33.3333	33.3333	33.3333
3	GCN-4%	100	52.380952	51.4286	43.8095	41.9048	41.9048	41.9048	41.9048	41.9048	41.9048	41.9048	40.9524	40.9524	40	40	40	40

Tabelul 12 sintetizează statistic aceste tendințe. Media masei procentuale (avg) confirmă comportamentul observat în tabelele anterioare: GCN-2% are cea mai mare valoare medie ($85.89 \pm 4.63\%$), urmată de GCN-0.5% ($71.64 \pm 3.21\%$) și GCN-1% ($53.93 \pm 4.6\%$). Pe de altă parte, GC31 și GCN-4% înregistrează cele mai scăzute mase rămase și cele mai mari diferențe statistice ($38.86 \pm 33.66\%$, respectiv $27.65 \pm 15.95\%$). Valorile p calculate indică diferențe statistice semnificative între grupurile GCN-2% și GC31 ($p < 0.005$), respectiv între GCN-4% și toate celelalte formulări ($p < 0.001$), confirmând impactul concentrației de NFs asupra stabilității scaffoldului.

Tabelul 12. Media masei procentuale (avg), calculul deviației standard (stdev) și al valorii

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

statistice p (p value)

analize	Proba	0 zile	1 zi	2 zile	3 zile	4 zile	5 zile	12 zile	19 zile	26 zile	33 zile	40 zile	47 zile	54 zile	61 zile	68 zile	75 zile	82 zile
avg	GC31	100	64.145431	64.1454	63.1122	62.7614	61.7282	61.336	60.3441	59.952	58.9601	58.9601	56.6861	55.0532	52.3871	49.1819	45.6259	38.8648
stdev	GC31	0	2.9633962	2.9634	3.9319	3.36882	4.33813	4.46429	4.75631	4.84651	5.18354	5.18354	7.76436	9.51504	12.1795	17.6934	22.8891	33.6642
p value	GC31	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
avg	GCN-0.5%	100	91.444062	90.449	89.0815	84.396	84.396	82.9583	82.9583	82.9583	82.9583	81.4351	81.4351	80.495	75.553	75.1257	75.1257	71.6431
stdev	GCN-0.5%	0	0.9554245	0.78716	0.56046	3.21406	3.21406	3.14896	3.14896	3.14896	3.14896	3.35646	3.35646	4.16817	7.32633	7.89483	7.89483	3.21914
p value	GCN-0.5%	0.0001096	0.00012	0.00035	0.00129	0.0019	0.00237	0.00236	0.00232	0.00237	0.00324	0.00714	0.01324	0.04768	0.0812	0.10246	0.16849	0.16849
avg	GCN-1%	100	58.882301	58.5456	57.1476	56.7852	56.7852	55.9655	55.9655	55.9655	55.9655	55.9655	55.9655	55.9655	54.421	53.9379	53.9379	53.9379
stdev	GCN-1%	0	4.8570355	5.32086	5.26917	4.78861	4.78861	5.2046	5.2046	5.2046	5.2046	5.2046	5.2046	5.2046	4.63482	4.60842	4.60842	4.60842
p value	GCN-1%	0.1843709	0.18648	0.19119	0.15181	0.25579	0.24642	0.34263	0.38657	0.51907	0.51907	0.90022	0.89121	0.80028	0.67566	0.57086	0.48512	0.48512
avg	GCN-2%	100	93.479488	91.4954	89.3989	88.5326	88.5326	88.5326	87.6464	87.6464	87.6464	87.6464	87.6464	87.6464	85.894	85.894	85.894	85.894
stdev	GCN-2%	0	3.0939494	4.24277	4.05911	4.73035	4.73035	4.73035	4.26052	4.26052	4.26052	4.26052	4.26052	4.26052	4.63994	4.63994	4.63994	4.63994
p value	GCN-2%	0.0002895	0.00079	0.00129	0.00154	0.00194	0.00193	0.00177	0.00175	0.00177	0.00177	0.00376	0.00564	0.01122	0.02544	0.04048	0.0746	0.0746
avg	GCN-4%	100	53.978805	49.6822	44.022	42.5839	42.2007	40.2112	40.2112	40.2112	39.828	36.3059	33.1772	30.3659	31.2902	27.2557	28.4605	27.6573
stdev	GCN-4%	0	3.3525042	1.63313	0.48624	0.95683	0.31322	2.49224	2.49224	2.49224	2.30412	4.94609	8.5035	13.1379	9.18928	16.6376	14.5991	15.9567
p value	GCN-4%	0.0170248	0.00178	0.00113	0.00057	0.00147	0.00202	0.0029	0.00329	0.00428	0.00541	0.0241	0.05782	0.07476	0.19294	0.33497	0.62984	0.62984

Figura 4 ilustrează vizual cinetica degradării probelor în funcție de timp, unde se poate observa că formulările GC31 (a) și GCN-4% (e) prezintă o curbă descendentă accentuată, semnalând o pierdere semnificativă a masei, în special după prima săptămână. În schimb, GCN-2% (d) menține o linie aproape plată, cu o scădere minimă a masei, sugerând o rețea fizico-chimică mai stabilă. GCN-0.5% (b) și GCN-1% (c) prezintă o degradare moderată, cu o tendință constantă, fără oscilații bruște, ceea ce poate indica o reactivitate chimică echilibrată și o integrare potențială bună în medii biologice.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

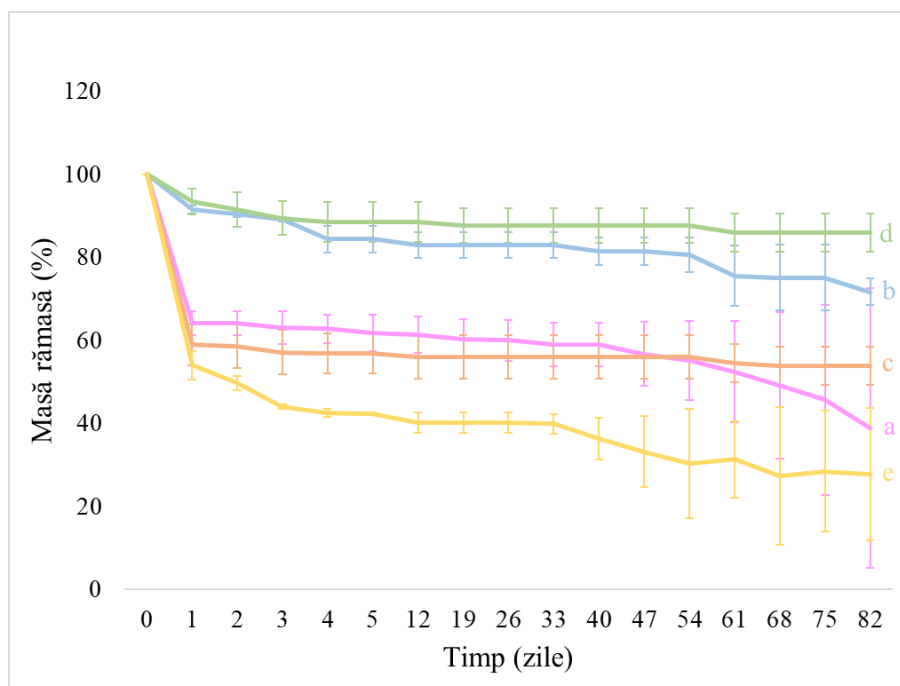


Figura 4. Cinetica de degradare a structurilor printate GC31 (a), GCN-0.5% (b), GCN-1% (c), GCN-2% (d) și GCN-4% (e) timp de 82 zile.

I.2.1.4. Concluzii

Studiul extins asupra stabilității scaffoldurilor printate 3D pe o perioadă de 82 de zile a evidențiat o influență semnificativă a concentrației de NFs asupra comportamentului de degradare al acestora. Rezultatele au arătat că formulările cu adaos moderat de NFs, în special GCN-2%, au prezentat o stabilitate excelentă, păstrând peste 85% din masa inițială până la finalul testului, ceea ce le recomandă pentru aplicații în care este necesar un suport mecanic susținut pe termen lung. Probele GCN-0.5% și GCN-1% au avut o degradare lentă și controlată, menținând caracteristici structurale favorabile pentru utilizări în regenerarea osoasă graduală.

În schimb, formularea GCN-4% a suferit o degradare accelerată, cu pierderi masive de masă încă din primele zile de incubare, sugerând o rețea polimerică mai puțin stabilă. Acest comportament ar putea fi valorificat în aplicații unde este necesară o integrare rapidă a

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

scaffoldului sau o eliberare accelerată a unor agenți bioactivi. Prin urmare, alegerea concentrației optime de NFs trebuie realizată în funcție de specificul aplicației clinice, având în vedere echilibrul necesar între stabilitatea structurală și rata dorită de degradare. Aceste rezultate contribuie la optimizarea formulărilor pentru aplicații personalizate în ingineria tisulară osoasă.

I.2.2. Studii de eficientizare a adsorbției ASO pe nanoplatforme grafenice

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

I.2.2.1. Introducere

În cercetările curente dedicate regenerării osoase și tratamentului complicațiilor asociate cu mielomul multiplu, utilizarea materialelor biocompatibile avansate și a tehnologiilor de printare 3D devine din ce în ce mai importantă. Proiectul nostru, Advanced & Personalized Solutions for Bone Regeneration and Complications Associated with Multiple Myeloma (REOSTEOMI), se concentrează pe dezvoltarea unor soluții inovatoare care integrează scaffolduri personalizate, optimizate pentru a sprijini atât regenerarea osoasă, cât și tratamentele specifice pentru mielomul multiplu.

Un aspect remarcabil al acestui proiect este utilizarea platformelor de grafenă carboxilată (GO-COOH), care oferă oportunități unice pentru legarea ADN-ului specific mielomului multiplu. Funcționalizarea scaffoldurilor cu oligonucleotide antisens (ASOs) se dovedește a fi o abordare promițătoare în inhibarea expresiei genelor asociate progresiei bolii. Această integrare a platformelor grafenice permite nu doar susținerea procesului de regenerare osoasă, ci și facilitarea tratamentelor țintite pentru cancer.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

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 raport științific, ne propunem să analizăm legarea oligonucleotidelor antisens în medii complexe de platformele GO-COOH modificate cu EDC-NHS, punând accent pe metodele de îmbunătățire a eficienței de adsorbție.

I.2.2.2. Materiale și sinteza nanoplatformelor grafenice

Materiale

Albumina serică bovină (BSA), clorhidrat (Tris-HCl), $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_3\text{Na}$ (dodecil sulfat de sodiu-SDS), MgCl_2 și au fost achiziționate de la Sigma-Aldrich, cu sediul în St. Louis, MO, SUA. FAM-ssADN, marcat cu 6-carboxifluoresceină la capatul final și având secvența 5'- 6 FAM TCA-GTC- TGA-TAA-GCT-A -3', a fost achiziționat de la Integrated ADN Technologies, Inc. (Coralville, IA, SUA). În plus, GO-COOH, fost procurat de la ACS-Materials (Pasadena, CA, SUA).

Prepararea dispersiei de GO-COOH

GO-COOH au amplasate într-un singur pahar Berzelius care conținea 10 mL de apă ultrapură, formând o dispersie cu o concentrație finală de 1 mg/mL (figura 5 A.). Pentru a obține dispersia, a fost utilizat un sonicator VC×750 (Sonics & Materials, Inc., Newtown, CT, SUA) timp de 2 ore, menținând dispersia într-o baie de gheață pentru a preveni supraîncălzirea. Sonicatorul a funcționat în cicluri de 10 secunde de pulsații active urmate de o pauză de 5 secunde, cu o frecvență constantă de 20 kHz pe parcursul întregului proces.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

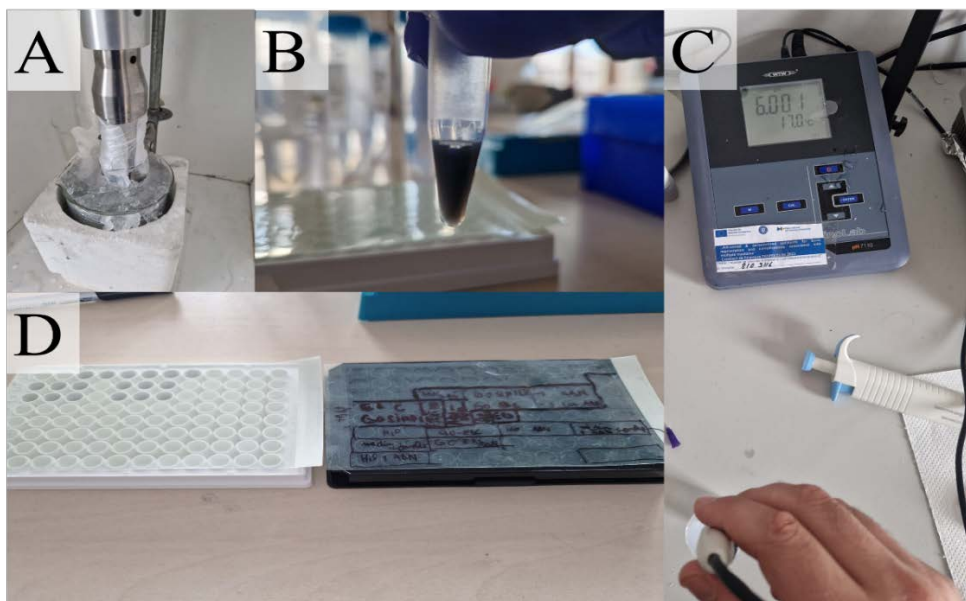


Figura 5. A. Procesul de dispersare a platformelor grafenice prin ultrasonare; B. Dispersia platformelor grafenice după adăugarea mediului complex cu FAM-ssADN; C. Verificarea pH-ului mediului complex conținând dispersia de platforme grafenice; D. Procesul de adsorbție a FAM-ssADN din mediul complex prin incubarea platformelor grafenice în godeuri albe și negre.

Procesul de adsorbție și detectare a ssADN marcat cu FAM în soluții ionice utilizând platformele GO-COOH

Pentru adsorbția și detectarea oligonucleotidei ssADN marcate cu FAM, a fost preparată o soluție ionică complexă cu un volum final de 300 μ L, pe bază de α MEM, conținând 100 mM $MgCl_2$ (Figura 1B). În plus, fiecare soluție a fost suplimentată cu 0,1 mg/mL BSA, 10 mM Tris-HCl (pH 6,0), 0,1% SDS și 50 nM FAM-ssADN. Înainte de incubare, soluțiile au fost testate pentru a se confirma că pH-ul final este 6, valoare optimă pentru adsorbția eficientă a ADN-ului (Figura 1C). Soluțiile preparate au fost distribuite în plăci Costar negre, cu fund plat și 96 de godeuri, câte 100 μ L în fiecare godeu. De asemenea, au fost realizate experimente paralele în godeuri albe, pentru a valida completitudinea adsorbției secvențelor marcate fluorescent de către platformele grafenice (Figura 1D). Pentru procesul de adsorbție, platformele grafenice au fost incubate timp de 24 de ore în soluțiile ionice complexe, în vederea

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

promovării legării ssADN-ului marcat cu FAM. Ulterior fluorescența soluțiilor a fost analizat la o lungime de unde de 535 nm, folosind un cititor de microplăci. Măsurarea s-a bazat pe tehnica FRET, care detectează transferul de energie între două molecule sensibile la lumină atunci când acestea se află în proximitate, indicând o legare sau o interacțiune reușită.

Analiza spectrofluorimetrică

Intensitatea fluorescenței emise a fost evaluată la 23 °C folosind un cititor de microplăci de fluorescență TECAN Spark (Tecan Trading AG, Männedorf, Elveția), cu cinci măsurători efectuate per godeu, la o lungime de undă de 535 nm.

I.2.2.3. Rezultate și discuții

În cadrul experimentelor efectuate, s-a urmărit investigarea interacțiunii dintre ADN-ul marcat fluorescent și diverse platformele GO-COOH, prin monitorizarea modificărilor intensității fluorescenței. Rezultatele obținute au indicat variații semnificative ale semnalului fluorescent în timp și în funcție de materialele utilizate. Un criteriu esențial pentru evaluarea eficienței adsorbției este menținerea unei intensități a fluorescenței cât mai apropiate de cea a soluției martor care conține doar GO-COOH. Această referință permite stabilirea unui prag optim de interacțiune: un semnal fluorescent foarte scăzut (stingere a fluorescenței sau quenching) ar putea indica o adsorbție excesivă, în timp ce un semnal prea ridicat poate sugera o interacțiune slabă.

Conform experimentelor, pentru fiecare control și platforma s-au realizat câte trei probe fiind calculate media acestora, în scopul confirmării veridicității rezultatelor. În Tabelul 1.3.1 este prezentată media valorilor obținute pentru fiecare set de măsurători, la un minut după incubarea platformelor grafenice.

După cum se poate observa în Tabelul 1.3.1, apa (H₂O) are, așa cum era de așteptat, o valoare foarte scăzută a fluorescenței (27,8 r.f.u.), fiind utilizată ca martor negativ, fără ADN

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

sau grafenă. FAM-ssADN (fără grafenă) prezintă cea mai mare intensitate de fluorescență: 4708,6 r.f.u., reflectând prezența liberă a oligonucleotidelor marcate fluorescent în soluție.

Tabelul 13. Intensitatea fluorescenței pentru apă, 50 nM FAM-ssADN, GO-COOH, GO-COOH după incubare în mediul complex cu FAM-ssADN, GO-COOH modificat cu EDC-NHS, și GO-COOH/EDC-NHS după incubare în mediul complex cu FAM-ssADN.

	H ₂ O	FAM-ssADN	GO-COOH	GO-COOH/FAM-ssADN	GO-COOH/EDC-NHS	GO-COOH/EDC-NHS/FAM-ssADN
	Intensitatea Fluorescenței (r.f.u.- unități relative de fluorescență)					
P1	31	4417.4	279.4	1235.8	110.8	1470.6
P2	26.2	5110.6	357.6	959.2	131.8	1416.2
P3	26.2	4597.8	340.4	1176.2	133.2	1317
Media	27.8	4708.6	325.8	1123.7	125.3	1401.3

În cazul platformelor GO-COOH, valoarea intensității fluorescenței este semnificativ mai mare comparativ cu cea a apei, ceea ce indică prezența unui număr mai mare de particule GO-COOH în soluție. Această creștere poate fi atribuită aglomerării parțiale a particulelor, care determină o dispersie mai slabă și, implicit, o detecție mai evidentă a semnalului fluorescent rezidual. Atunci când aceste platforme sunt incubate în soluția cu FAM-ssADN, se observă o

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

adsorbție semnificativă a oligonucleotidelor, valoarea fluorescenței fiind de 1123.7 unități relative, după un minut de la incubare.

În cazul platformelor GO-COOH modificate cu EDC-NHS, se observă o valoare mai mică a fluorescenței, apropiată de cea a apei de 125.3 unități relative de fluorescență, ceea ce sugerează că modificarea chimică cu EDC-NHS a contribuit atât la îmbunătățirea dispersiei particulelor grafenice, cât și la reducerea semnalului fluorescent de fond. Atunci când aceste platforme sunt incubate în soluția cu secvențe de ADN marcate fluorescent, se observă o adsorbție rapidă a acestora pe suprafața GO-COOH/EDC-NHS cu valori de 1401.3 unități relative de fluorescență. Deși valoarea fluorescenței este mai ridicată decât în cazul GO-COOH nemodificat, acest aspect poate indica formarea unor legături covalente stabile între grupările activate de EDC-NHS și grupările funcționale ale ADN-ului, legături mai puternice decât cele de hidrogen sau interacțiunile nespecifice stabilite de grafena nemodificată.

Tabelul 14. Media intensității fluorescenței pentru platformele GO-COOH și GO-COOH/EDC-NHS după incubare în mediul complex cu FAM-ssADN, la diferite intervale de timp în gode-uri negre.

	GO-COOH/FAM-ssADN	GO-COOH/EDC-NHS/FAM-ssADN
	Intensitatea Fluorescenței (r.f.u.)	
1 min	1123.7	1401.3
15 min	380.8	995.9
30 min	378.6	895.6
1 oră	383.4	895.6
2 ore	391.7	838.9
3 ore	378.6	721.7
4 ore	389.1	694.9
24 ore	505.2	395.1

În tabelul 14 sunt prezentate valorile intensității fluorescenței pentru oligonucleotida marcată fluorescent (FAM-ssADN) în prezența a două tipuri de platforme grafenice: GO-COOH și GO-COOH/EDC-NHS, incubate în mediu complex, la diferite intervale de timp.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

Scăderea intensității fluorescenței a fost interpretată ca indicator al procesului de legare a ssADN la suprafața platformelor, având în vedere fenomenul de stingere specific interacțiunilor dintre fluorofori și materiale pe bază de carbon.

Datele experimentale indică o scădere rapidă a fluorescenței în cazul platformei GO-COOH în primele 15 minute, de la 1123,7 r.f.u. la 380,8 r.f.u., sugerând o adsorbție rapidă și, cel mai probabil, necovalentă a ssADN, prin interacțiuni electrostatice și π - π stacking. Interacțiunile necovalente, precum cele ionice, legăturile de hidrogen și forțele van der Waals, sunt interacțiuni electrostatice slabe care nu implică schimbul de electroni și, datorită caracterului lor reversibil, se pot forma și rupe rapid, fiind astfel mai dinamice decât legăturile covalente fapt evidențiat prin stingerea semnificativă a fluorescenței încă din primele minute de la incubare. Ulterior, valorile fluorescenței se stabilizează, ceea ce sugerează atingerea unui echilibru între moleculele adsorbite și cele rămase în soluție.

Pentru platforma funcționalizată GO-COOH/EDC-NHS, scăderea fluorescenței este mai lentă, menținând valori semnificativ mai mari în primele ore de incubare (995.9 r.f.u. la 15 min; 895.6 r.f.u. la 1 oră). Acest comportament este atribuit formării de legături covalente între grupările carboxil activate (prin EDC-NHS) de pe suprafața platformelor GO-COOH și grupările amina de pe ssADN, ceea ce conferă o imobilizare mai eficientă și stabilă a oligonucleotidelor.

După 24 de ore de incubare în mediu complex, valorile intensității fluorescenței pentru ambele platforme grafenice prezintă modificări semnificative, în special în cazul GO-COOH. Astfel, fluorescența măsurată pentru GO-COOH ajunge la ~505.2 r.f.u., în timp ce pentru platforma funcționalizată GO-COOH/EDC-NHS valoarea este mai scăzută, ~395 r.f.u.

Această diferență indică faptul că interacțiunile dintre FAM-ssADN și suprafața GO-COOH sunt mai puțin stabile pe termen lung, iar o parte din oligonucleotidele adsorbite inițial se pot elibera în soluție, contribuind la creșterea fluorescenței în mediul lichid.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

Comportamentul este specific interacțiunilor necovalente, care sunt reversibile și dinamice, permițând desprinderea moleculelor de ADN în timp.

Prin contrast, platforma GO-COOH/EDC-NHS menține un nivel mai scăzut al fluorescenței la 24 h, ceea ce sugerează o imobilizare mai eficientă și stabilă a ssADN, prin formarea de legături covalente între grupările funcționale activate de pe suprafața grafenică și grupările amina ale oligonucleotidei. Aceste rezultate confirmă că modificarea cu EDC-NHS poate îmbunătăți capacitatea platformelor grafenice de a lega oligonucleotidele într-un mod mai controlat și durabil, aspect esențial pentru aplicațiile în domeniul ingineriei tisulare și al livrării de material genetic.

Tabelul 15. Media intensității fluorescenței pentru platformele GO-COOH și GO-COOH/EDC-NHS după incubare în mediul complex cu FAM-ssADN, la diferite intervale de timp în gode-uri albe.

	GO-COOH	GO-COOH/FAM-ssADN	GO-COOH/EDC-NHS	GO-COOH/EDC-NHS-FAM-ssADN
	Intensitatea Fluorescenței (r.f.u.)			
1 min	3680.6	4011.9	3532.1	4230.4
2 ore	3519.8	3778.0	3594.0	3978.4
4 ore	3609.8	3794.9	3665.2	3998.6

Datele obținute arată comportamente diferite ale platformelor GO-COOH și GO-COOH-EDC/NHS în prezența oligonucleotidei marcate fluorescent (FAM-ssADN), după incubare în mediu complex în gode-uri albe (Tabelul 15).

La 1 minut, fluorescența este maximă pentru toate probele cu ssADN: 4011.9 r.f.u. pentru GO-COOH/FAM-ssADN și 4230.4 r.f.u. pentru GO-COOH/EDC-NHS/FAM-ssADN. Ulterior, se observă o scădere treptată a fluorescenței, mai accentuată în cazul GO-COOH, până la 3794.9 r.f.u. la 4 ore, comparativ cu 3998.6 r.f.u. pentru platforma modificată.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

Scăderea mai rapidă în cazul GO-COOH indică o adsorbție necovalentă (π - π stacking, interacțiuni electrostatice) a ssADN, în timp ce cinetica mai lentă în cazul GO-COOH/EDC-NHS reflectă o imobilizare covalentă mai controlată și mai stabilă, datorită reacției cu EDC-NHS.

Platformele fără ssADN au fluorescențe relativ constante (ex. GO-COOH: ~3680–3795 r.f.u.), confirmând că modificările semnificative observate sunt cauzate de interacțiunea cu oligonucleotidele. Prin urmare, funcționalizarea chimică cu EDC-NHS conferă platformelor grafenice o capacitate superioară de imobilizare controlată și stabilă a oligonucleotidelor.

Tabelul 16 prezintă valorile fluorescenței obținute după 24 de ore de incubare pentru o serie de șapte experimente desfășurate pe două tipuri de platforme grafenice GO-COOH și GO-COOH/EDC-NHS – în prezența FAM-ssADN, într-un mediu complex. Datele arată în mod consecvent că platforma GO-COOH/FAM-ssADN prezintă valori mai ridicate ale fluorescenței (între 456.0 și 530.5 r.f.u.), în comparație cu GO-COOH/EDC-NHS/FAM-ssADN, care se menține la valori mai scăzute și mai stabile (între 376.9 și 416.6 r.f.u.).

Tabelul 16. Rezultatele fluorescenței obținute pentru o serie de experimente cu platformele GO-COOH și GO-COOH/EDC-NHS incubate în mediu complex cu FAM-ssADN după 24 de ore (gode-uri negre).

	GO-COOH/FAM-ssADN	GO-COOH/EDC-NHS/FAM-ssADN
	Intensitatea Fluorescenței (r.f.u.)	
Exp. 1	505.2	395.1
Exp. 2	457.2	376.9
Exp. 3	493.6	379.7
Exp. 4	487.7	385.9
Exp. 5	456.0	383.8
Exp. 6	530.5	408.2
Exp. 7	483.3	416.6

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

Aceste diferențe indică faptul că legarea ssADN-ului pe suprafața GO-COOH are loc prin interacțiuni necovalente, precum stacking π - π și forțe electrostatice, care sunt reversibile și instabile în timp. Pe măsură ce trece timpul, o parte semnificativă din ssADN se eliberează în soluție, fenomen reflectat de fluorescența crescută, întrucât fluoroforul FAM nu mai este stins de proximitatea cu suprafața carbonică.

În schimb, platforma GO-COOH/EDC-NHS asigură o imobilizare covalentă a ssADN, datorită activării grupărilor carboxilice cu EDC și NHS, care reacționează eficient cu grupările amina de pe oligonucleotidă. Această legare chimică este mult mai stabilă și reduce mobilitatea moleculelor, ceea ce se reflectă prin valori mai reduse ale fluorescenței, constante între experimente.

I.2.2.4. Concluzii

Studiul de față a investigat comportamentul a două tipuri de platforme grafenice – GO-COOH și GO-COOH/EDC-NHS – în interacțiunea lor cu oligonucleotide marcate fluorescent (FAM-ssADN), în condiții de incubare în mediu complex, pe parcursul mai multor intervale de timp. Evaluarea acestor interacțiuni s-a realizat prin monitorizarea intensității fluorescenței, un indicator indirect al procesului de adsorbție sau imobilizare a ssADN pe suprafața platformelor.

Rezultatele obținute au evidențiat comportamente distincte între cele două tipuri de materiale, reflectând diferențe fundamentale în mecanismul de interacțiune. Platforma GO-COOH, care interacționează preponderent prin legături necovalente, a prezentat o adsorbție rapidă, vizibilă printr-o scădere accentuată a fluorescenței în primele 15 minute (de la 1123,7 r.f.u. la 380,8 r.f.u.). Această adsorbție este însă instabilă în timp, fenomen reflectat de creșterea valorii fluorescenței după 24 de ore (~505.2 r.f.u., medie între 456 și 530.5 r.f.u.), ceea ce sugerează o desorbție parțială a oligonucleotidei din cauza caracterului reversibil al interacțiunilor necovalente.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

Pe de altă parte, platforma GO-COOH/EDC-NHS, funcționalizată chimic pentru a forma legături covalente între grupările carboxil activate și grupările amina ale ssADN-ului, a arătat o adsorbție mai lentă, dar mult mai stabilă în timp. Fluorescența s-a redus progresiv (de la 1401.3 la 395 r.f.u. după 24h), iar valorile obținute în cele șapte experimente (între 376.9 și 416.6 r.f.u.) au fost constante și reproductibile. Acest comportament reflectă formarea unor legături puternice și durabile, ceea ce face ca platforma să fie mult mai potrivită pentru aplicații ce necesită o imobilizare eficientă și controlată a materialului genetic.

În plus, valorile fluorescenței obținute pentru martori (ex. apă: 27.8 r.f.u., FAM-ssADN: 4708.6 r.f.u.) confirmă fiabilitatea metodei utilizate și pun în evidență rolul lor al interacțiunilor platformă-ADN în modificarea semnalului fluorescent.

Platformele fără ADN au prezentat fluorescență relativ constantă, confirmând că modificările observate în prezența FAM-ssADN sunt specifice procesului de legare. De asemenea, faptul că platforma GO-COOH/EDC-NHS reduce semnalul fluorescent mai eficient sugerează o dispersie mai bună a particulelor în soluție și o capacitate superioară de legare specifică.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

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

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

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

II.1.1. Studii privind analiza structurii semi-cristaline a scaffoldurilor din GelMA, gellan metacrilat și diferite concentrații de oxid de grafenă

II.1.1.1. Introducere

Pentru ca un biomaterial destinat regenerării osoase să reproducă eficient caracteristicile țesutului osos natural, acesta trebuie să imite nu doar arhitectura geometrică generală și gradul de porozitate, ci și organizarea structurală specifică osului [1], [2]. Deși structurile biologice naturale evidențiază rolul esențial al organizării ierarhice în obținerea performanțelor mecanice specifice, reproducerea fidelă a acestei organizări în structurile pentru regenerare osoasă reprezintă un proces complex și greu de realizat [3]. În acest context, caracterizarea structurii cristaline prezente în substituentul osos devine esențială pentru evaluarea gradului în care materialul poate susține regenerarea osoasă [4]. Difrakția de raze X (XRD) constituie o tehnică analitică esențială în caracterizarea materialelor utilizate în ingineria tisulară, în special pentru determinarea compoziției fazelor cristaline și evaluarea structurii cristaline la scară atomică. Prin analiza difractogramelor obținute în urma interacțiunii razelor X cu rețelele cristaline ale materialului, XRD permite identificarea precisă a fazelor minerale prezente, determinarea gradului de cristalinătate și a dimensiunii cristalitelor [5], [6]. Prezentul studiu se focusează pe analiza XRD a probelor pe bază de gelatină metacrilată (GelMA) și gellan metacrilat, ranforsate cu diferite concentrații de oxid de grafenă (GO) – 0%, 0.125%, 0.25% și 0.5%. Sinteza formulărilor, printarea 3D și liofilizarea structurilor au fost descrise într-un raport anterior.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

II.1.1.2. Materiale

Structura scaffold-urilor a fost investigată prin XRD utilizând un sistem Malvern-PANalytical Empyrean (Almelo, Țările de Jos) echipat cu o sursă de radiație CuK α cu lungimea de undă de 1,54065 Å. Probele au fost analizate în intervalul de unghi 2 θ de la 5° până la 60°, cu un pas de 0,026°, cu 0,5s/pas și rotirea la o viteză de revoluție de 0,5s. Distanța d dintre straturi a fost calculată în conformitate cu legea lui Bragg, după cum se arată în ecuația (1), unde n reprezintă ordinul de reflexie, λ este lungimea de undă a razelor X, iar θ este unghiul de difracție.

$$n\lambda = 2d \sin \theta \quad (1)$$

Dimensiunea medie a domeniilor ordonate τ a fost determinată prin aplicarea ecuației (2), unde K reprezintă factorul de formă (constantă), iar FWHM este lățimea totală la jumătate de maxim.

$$\tau = (K\lambda) / (\text{FWHM} \cos \theta) \quad (2)$$

II.1.1.3. Rezultate

Difractogramele XRD ale structurilor compozite (Figura 6) au fost înregistrate pentru a determina fazele structurale și pentru a calcula diferiți parametri precum lățimea la jumătatea înălțimii maxime (FWHM), distanța dintre straturi d și dimensiunea medie a domeniilor ordonate τ .

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

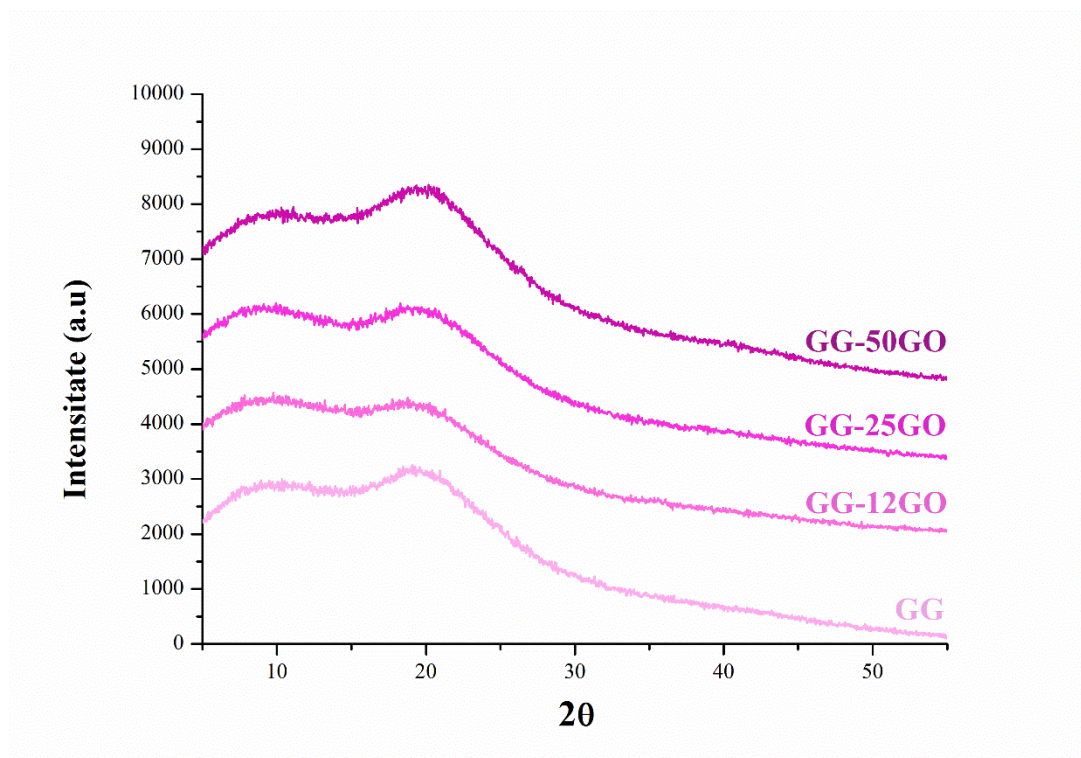


Figura 6. Analiza XRD a structurilor pe bază de GelMA și gellan metacrilat, ranforsate cu diferite concentrații de GO

Primul parametru parametru evaluat a fost FWHM, reprezentând un parametru cantitativ care caracterizează lărgimea unui vârf de difracție la jumătatea intensității maxime și fiind direct corelat cu gradul de ordine cristalină al materialului. În analiza XRD, o valoare redusă a FWHM indică o structură cristalină bine definită, cu cristalite de dimensiuni mari și cu un nivel redus de defecte sau tensiuni interne. Rezultatele FWHM pentru cele 4 structuri sunt prezentate în Tabelul 17. Se poate observa că atât în cazul vârfului de difracție de la $\sim 9^\circ$, cât și în cazul celui de la 19° , cele mai scăzute valori ale FWHM sunt obținute pentru probele cu concentrații de GO cuprinse între 0,125 și 0,25%, indicându-se astfel că acestea prezintă o structură mai ordonată.

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

Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – 18

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

Tabelul 17. Valorile FWHM pentru cele două vârfuri de difracție

Proba	2 θ (°)	FWHM
GG	9,45	4,41
GG-12GO	9,61	4,27
GG-25GO	9,11	4,18
GG-50GO	9,98	4,32
GG	19,34	4,27
GG-12GO	18,7	2,29
GG-25GO	19,23	3,62
GG-50GO	19,23	4,37

Distanța interplanară d reprezintă distanța dintre planurile atomice paralele din rețeaua cristalină a unui material. Aceasta este direct legată de poziția vârfurilor de difracție din cadrul XRD, conform legii lui Bragg. Tabelul 18 prezintă valorile d înregistrate. Valorile d mai ridicate pentru probele cu 0,125% și 0,25% GO pot indica prezența unei structuri mai relaxate.

Tabelul 18. Valorile d pentru cele două vârfuri de difracție

Proba	2 θ	d
GG	9,45	0.94
GG-12GO	9,61	0.92
GG-25GO	9,11	0.97
GG-50GO	9,98	0.89
GG	19,34	0.46
GG-12GO	18,7	0.47
GG-25GO	19,23	0.46
GG-50GO	19,23	0.46

De asemenea, dimensiunea medie a domeniilor ordonate τ reprezintă o mărime cristalină fundamentală ce descrie extinderea spațială a regiunilor dintr-un material în care rețeaua atomică prezintă o organizare periodică și coerentă. Determinarea valorii τ se realizează frecvent pe baza ecuației Scherrer, utilizând datele obținute din analiza FWHM dintr-un XRD.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

Această dimensiune oferă informații esențiale despre gradul de cristalinitate al materialului, precum și despre prezența eventualelor tensiuni interne sau fenomene de nano-structurare. Valorile mai ridicate ale τ (Tabelul 19) înregistrate pentru probele cu 0,125% și 0,25% GO indică o rețea mai stabilă și mai ordonată, cu puține defecte sau dislocații, favorabilă pentru aplicații în care stabilitatea structurală este esențială. O structură cristalină extinsă conferă rezistență mecanică mai mare, esențială pentru structurile pentru regenerare osoasă care trebuie să suporte sarcini biomecanice.

Tabelul 19. Valorile τ pentru cele două vârfuri de difracție

Proba	2 θ	τ
GG	9,45	1,89
GG-12GO	9,61	1,95
GG-25GO	9,11	1,99
GG-50GO	9,98	1,93
GG	19,34	1,97
GG-12GO	18,7	3,67
GG-25GO	19,23	2,32
GG-50GO	19,23	1,93

II.1.1.4. Concluzii

Analiza difracției de raze X (XRD) a permis evaluarea structurii cristaline a compozitelor pe bază de GelMA și gellan metacrilat, ranforsate cu diferite concentrații de GO, evidențiind influența conținutului GO asupra ordonării structurale a materialului. Valorile reduse ale FWHM înregistrate pentru probele GG-12GO și GG-25GO, la ambele unghiuri caracteristice ($\sim 9^\circ$ și $\sim 19^\circ$), indică o structură cristalină mai bine definită și un grad scăzut de defecte sau tensiuni interne în rețea. Această observație este susținută de valorile mai ridicate ale dimensiunii medii a domeniilor ordonate (τ), indicând o extindere a regiunilor coerent cristaline în aceste probe. De asemenea, valorile mai mari ale distanței interplanare d , în special

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

pentru vârful de la $\sim 9^\circ$, sugerează o ușoară relaxare a rețelei cristaline în prezența unor concentrații moderate de GO (0,125% și 0,25%), posibil corelată cu o adaptare structurală locală indusă de interacțiunea dintre rețeaua polimerică și GO.

În ansamblu, aceste rezultate evidențiază faptul că includerea GO în concentrații moderate favorizează formarea unei structuri cristaline mai ordonate, cu dimensiuni mai mari ale cristalitelor și cu o rețea mai stabilă. Aceste caracteristici sunt deosebit de relevante pentru aplicațiile în regenerarea osoasă, unde stabilitatea structurală, rezistența mecanică și gradul de cristalinitate sunt influențate direct de organizarea structurală.

II.1.1.5. Bibliografie

[1] W. E. Teo, S. Liao, C. Chan, and S. Ramakrishna, “Fabrication and characterization of hierarchically organized nanoparticle-reinforced nanofibrous composite scaffolds,” *Acta Biomater*, vol. 7, no. 1, pp. 193–202, Jan. 2011, doi: 10.1016/j.actbio.2010.07.041.

[2] X. Yu et al., “Controlling the structural organization of regenerated bone by tailoring tissue engineering scaffold architecture,” *J Mater Chem*, vol. 22, no. 19, p. 9721, 2012, doi: 10.1039/c2jm30332a.

[3] A. Cipitria et al., “Porous scaffold architecture guides tissue formation,” *Journal of Bone and Mineral Research*, vol. 27, no. 6, pp. 1275–1288, Jun. 2012, doi: 10.1002/jbmr.1589.

[4] A. Hajinasab, S. Saber-Samandari, S. Ahmadi, and K. Alamara, “Preparation and characterization of a biocompatible magnetic scaffold for biomedical engineering,” *Mater Chem Phys*, vol. 204, pp. 378–387, Jan. 2018, doi: 10.1016/j.matchemphys.2017.10.080.

[5] J. Epp, “X-ray diffraction (XRD) techniques for materials characterization,” in *Materials Characterization Using Nondestructive Evaluation (NDE) Methods*, Elsevier, 2016, pp. 81–124. doi: 10.1016/B978-0-08-100040-3.00004-3.

[6] H. Khan, A. S. Yerramilli, A. D’Oliveira, T. L. Alford, D. C. Boffito, and G. S. Patience, “Experimental methods in chemical engineering: X-ray diffraction spectroscopy—XRD,” *Can J Chem Eng*, vol. 98, no. 6, pp. 1255–1266, Jun. 2020, doi: 10.1002/cjce.23747.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

II.2. CAPITOL 2

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

II.2.1. Studiul cineticii de legare a moleculelor ASO de nanoplatforme grafenice activate cu EDC-NHS

II.2.1.1. Introducere

În contextul dezvoltării unor terapii avansate pentru regenerarea osoasă și combaterea complicațiilor asociate mielomului multiplu, materialele biocompatibile moderne și tehnologiile de printare 3D capătă un rol esențial. Proiectul nostru, Advanced & Personalized Solutions for Bone Regeneration and Complications Associated with Multiple Myeloma (REOSTEOMI), urmărește crearea unor soluții inovatoare prin integrarea scaffoldurilor personalizate, proiectate pentru a susține simultan regenerarea osoasă și terapiile specifice acestei forme de cancer.

O direcție deosebit de promițătoare în cadrul acestui proiect este reprezentată de utilizarea platformelor pe bază de grafenă carboxilată (GO-COOH), care oferă premisele legării eficiente a ADN-ului specific mielomului multiplu. Funcționalizarea scaffoldurilor cu oligonucleotide antisens (ASOs) se conturează drept o strategie relevantă pentru inhibarea expresiei genelor implicate în progresia bolii. Astfel, aceste platforme grafenice contribuie atât la susținerea procesului de regenerare osoasă, cât și la facilitarea tratamentelor țintite.

În acest raport științific, ne propunem să investigăm legarea oligonucleotidelor antisens în medii complexe, utilizând platforme GO-COOH modificate cu EDC-NHS, cu accent pe optimizarea eficienței de adsorbție. Totodată, ne propunem analizarea platformelor obținute

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

din punct de vedere al fluorescenței (transferul energiei prin rezonanță Förster – FRET) și al structurii chimice, prin Spectroscopie cu Transformată Fourier (FTIR) și Spectroscopie Raman.

II.2.1.2. Materiale și sinteză

Materiale

GO-COOH a fost procurat de la ACS-Materials (Pasadena, CA, SUA). De asemenea, FAM-ssADN, marcat cu 6-carboxifluoresceină la capătul 5' și având secvența 5'-6 FAM TCA-GTC-TGA-TAA-GCT-A-3', a fost achiziționat de la Integrated DNA Technologies, Inc. (Coralville, IA, SUA). Albumina serică bovină (BSA), clorhidratul de Tris (Tris-HCl), dodecil sulfatul de sodiu ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_3\text{Na}$ – SDS) și MgCl_2 au fost achiziționate de la Sigma-Aldrich, cu sediul în St. Louis, MO, SUA.

Prepararea dispersiei de GO-COOH

GO-COOH au fost plasate într-un pahar Berzelius ce conținea 10 mL de apă ultrapură, obținându-se astfel o dispersie cu o concentrație finală de 1 mg/mL (Figura 1.A). Pentru realizarea dispersiei, s-a utilizat un sonicator VC×750 (Sonics & Materials, Inc., Newtown, CT, SUA), timp de 2 ore, menținând proba într-o baie de gheață pentru a preveni supraîncălzirea. Sonicatorul a fost operat în regim de lucru ciclic: 10 secunde de pulsații urmate de 5 secunde de pauză, cu o frecvență constantă de 20 kHz pe toată durata procesului.

Procesul de adsorbție și detectare a ssADN marcat cu FAM în soluții ionice utilizând platformele GO-COOH

Pentru studiul adsorbției și detecției oligonucleotidei ssADN marcate cu fluoroforul FAM, a fost pregătită o soluție ionică complexă cu un volum final de 300 μL , având ca bază αMEM și conținând 100 mM MgCl_2 . Suplimentar, fiecare soluție a fost completată cu 0,1 mg/mL albumină serică bovină (BSA), 10 mM Tris-HCl (pH 6,0), 0,1% dodecil sulfat de sodiu (SDS) și 50 nM FAM-ssADN. Înainte de etapa de incubare, pH-ul final al fiecărei soluții

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

a fost verificat și ajustat, dacă era necesar, pentru a asigura menținerea valorii de 6, considerată optimă pentru adsorbția eficientă a ADN-ului.

Soluțiile astfel pregătite au fost distribuite în plăci de tip Costar, negre, cu fund plat și 96 de godeuri, câte 100 μ L per godeu. În paralel, au fost efectuate experimente în plăci albe pentru a valida eficiența completă a adsorbției secvențelor marcate fluorescent de către platformele grafenice.

Pentru procesul de adsorbție, platformele GO-COOH au fost incubate timp de 24 de ore în soluțiile ionice complexe, cu scopul de a facilita legarea oligonucleotidelor marcate cu FAM. Ulterior, fluorescența reziduală a soluțiilor a fost evaluată la o lungime de undă de 535 nm, utilizând un cititor de microplăci. Măsurarea fluorescenței s-a bazat pe principiul transferului de energie prin rezonanță Förster (FRET), care permite detecția interacțiunilor moleculare apropiate, indicând astfel succesul legării oligonucleotidelor de suprafața platformei grafenice.

Analiza spectrofluorimetrică

Intensitatea fluorescenței emise a fost evaluată la 23 °C folosind un cititor de microplăci de fluorescență TECAN Spark (Tecan Trading AG, Männedorf, Elveția), cu cinci măsurători efectuate per godeu, la o lungime de undă de 535 nm.

Analize ale structurii chimice

Analizele FTIR au fost efectuate pentru a examina interacțiunile dintre cele trei componente: SWCNT, GA și NC, utilizând spectrometrul SHIMADZU 8900 (Kyoto, Japonia). Spectrele FTIR au fost înregistrate într-un interval de 400-4000 cm^{-1} , cu o rezoluție de 4 cm^{-1} , iar fiecare probă a fost măsurată de 32 de ori fără nicio pregătire suplimentară a probei. Pentru a verifica consecvența rezultatelor, s-au efectuat analize duplicate pe membrana NC virgină, membrana SWCNT/GA-NC, SWCNTs și pulberile GA.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

Măsurătorile Raman au fost realizate cu un spectrometru Raman confocal Renishaw inVia (Renishaw, Brno-Černovice, Republica Cehă), utilizând fie o excitație laser de 473 nm, fie de 785 nm. Spectrele Raman au fost colectate în intervalul 100–3200 cm^{-1} .

II.2.1.3. Rezultate și discuții

II.2.1.3.1. Analize de fluorescență

Interacțiunea dintre ADN-ul marcat fluorescent și platformele GO-COOH a fost evaluată prin monitorizarea modificărilor în intensitatea semnalului fluorescent, ca indicator al gradului de adsorbție al oligonucleotidelor pe suprafața materialelor grafenice. Aceste măsurători permit identificarea variațiilor în comportamentul de legare, în funcție de tipul platformei, condițiile de incubare și compoziția mediului reacțional.

Pentru asigurarea reproductibilității și validității statistice a datelor obținute, fiecare condiție experimentală a fost testată în trei replici independente. Pe baza acestor repetări, au fost calculate valorile medii ale fluorescenței, reducând astfel influența variațiilor experimentale accidentale și permițând o comparație riguroasă între platforme.

Valorile medii ale intensității fluorescente, măsurate la 24 de ore după incubarea platformelor grafenice în soluția ionică complexă cu FAM-ssADN, sunt prezentate în Tabelul 20.

Tabelul 20. Intensitatea fluorescenței pentru GO-COOH, GO-COOH după incubare în mediul complex cu FAM-ssADN, GO-COOH modificat cu EDC/NHS, și GO-COOH/EDC-NHS după incubare în mediul complex cu FAM-ssADN.

	GO-COOH/ssADN		GO-COOH/EDC-NHS/FAM-ssADN	
	Intensitatea Fluorescenței (r.f.u.- unități relative de fluorescență)			
U/M	r.f.u.	s.d.	r.f.u.	s.d.
E1	501.2	78.8	365	45.3
E2	498	79.0	416.2	51.3
E3	516.6	76.8	366.6	65.8
E4	478.2	35.1	376.8	43.7

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 – 18

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

E5	474	46.9	429.4	71.5
E6	545.4	82.5	386	51.3
E7	526.2	71.2	408.8	36.8

Rezultatele obținute evidențiază diferențe semnificative între cele două tipuri de platforme grafenice analizate GO-COOH și GO-COOH cu EDC-NHS în ceea ce privește capacitatea de adsorbție a oligonucleotidei marcate fluorescent (FAM-ssADN), după incubare în mediu complex.

Platforma GO-COOH-ssADN a prezentat valori mai ridicate ale fluorescenței, cuprinse între 474 și 545.4 r.f.u., ceea ce sugerează o adsorbție preponderent necovalentă, instabilă și reversibilă, realizată prin interacțiuni slabe. Deviațiile standard ridicate confirmă o variabilitate mare între probe, reflectând un control redus asupra procesului de legare.

În schimb, platforma GO-COOH/EDC-NHS-ssADN a prezentat valori mai scăzute și mai constante ale fluorescenței (365–429.4 r.f.u.), indicând o adsorbție mai eficientă și stabilă a ADN-ului, cel mai probabil prin formarea de legături covalente între grupările activate de EDC-NHS și grupările amina ale ADN-ului. Valorile mai mici ale fluorescenței reflectă o imobilizare mai bună și reducerea fluorescenței de fond, confirmând un comportament mai predictibil și mai reproductibil al acestei platforme.

Tabelul 21. Intensitatea medie a fluorescenței pentru platformele GO-COOH și GO-COOH-EDC/NHS după 72 h de incubare în mediu complex cu FAM-ssADN.

	GO-COOH/ssADN		GO-COOH/EDC-NHS/FAM-ssADN	
	Intensitatea Fluorescenței (r.f.u.- unități relative de fluorescență)			
U/M	r.f.u.	s.d.	r.f.u.	s.d.
E1	699	201.5	395.4	49.6
E2	731	109.2	396.6	55.4

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

E3	690	153.2	402.8	65.5
E4	586.6	141.9	314.8	25.6
E5	547	147.7	375.4	41.1
E6	722.4	186.34	389.4	62.3
E7	705.2	150.1	376.8	43.75

Tabelul 21 prezintă valorile medii ale intensității fluorescenței, exprimate în unități relative de fluorescență (r.f.u.), pentru platformele GO-COOH și GO-COOH/EDC-NHS, după 72 de ore de incubare în mediu complex cu FAM-ssADN. Analiza acestor date evidențiază comportamente diferite ale celor două platforme în ceea ce privește stabilitatea interacțiunii dintre suprafața grafenică și oligonucleotida marcată fluorescent. Pentru platforma GO-COOH, valorile fluorescenței sunt semnificativ mai mari, oscilând între 586,6 și 731,1 r.f.u., cu o medie situată în jurul valorii de 680 r.f.u. Această intensitate ridicată a fluorescenței sugerează o eliberare parțială a ssADN din matricea grafenică, ceea ce indică faptul că interacțiunile dintre ADN și suprafața GO-COOH sunt de natură slabă, în principal necovalente. Aceste interacțiuni, cum ar fi cele electrostatice, forțele van der Waals și π - π stacking, sunt de obicei reversibile și instabile în timp, ceea ce permite desprinderea treptată a oligonucleotidelor în soluție. Acest fenomen se traduce prin creșterea semnalului fluorescent, observat în valorile măsurate.

În schimb, platforma GO cu grupări carboxil activate chimic cu EDC-NHS prezintă valori semnificativ mai scăzute ale fluorescenței, între 375,4 și 402,8 r.f.u., indicând o interacțiune mult mai stabilă între ssADN și suprafața platformei. Funcționalizarea cu EDC-NHS activează grupările carboxil de pe grafenă, permițând formarea de legături covalente cu grupările amina ale oligonucleotidei. Aceste legături covalente sunt mult mai puternice și mai durabile decât cele necovalente, asigurând o imobilizare eficientă a ADN-ului pe termen lung și împiedicând eliberarea acestuia în mediu. De asemenea, valorile mai scăzute ale deviațiilor

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

standard (în special 43.75–71.5 r.f.u. pentru GO-COOH/EDC-NHS comparativ cu 109–201.5 r.f.u. pentru GO-COOH) demonstrează o mai bună reproductibilitate și o omogenitate mai mare a probelor activate cu EDC-NHS indicând un control experimental mai precis.

Prin urmare, rezultatele obținute susțin cu claritate superioritatea platformelor funcționalizate GO-COOH/EDC-NHS în ceea ce privește capacitatea de legare stabilă și controlată a oligonucleotidelor. Această proprietate este esențială în aplicații precum livrarea controlată de gene, biosenzori și sisteme de diagnostic molecular, unde stabilitatea interacțiunii material–biomoleculă este critică pentru performanță. În concluzie, activarea grupurilor carboxil cu EDC-NHS nu doar că reduce semnalul fluorescent de fond, ci și optimizează eficiența și durabilitatea imobilizării ssADN, confirmând valoarea adăugată a tratamentului chimic în dezvoltarea platformelor grafenice avansate.

Tabelul 22. Intensitatea medie a fluorescenței pentru platformele GO-COOH și GO-COOH-EDC/NHS după 1 minute, 24 ore și 72 ore de la incubarea în mediu complex cu FAM-ssADN.

	GO-COOH/FAM-ssADN		GO-COOH/EDC-NHS/ FAM-ssADN	
	Intensitatea Fluorescenței (r.f.u.- unități relative de fluorescență)			
U/M	r.f.u.	s.d.	r.f.u.	s.d.
1 min	380.8	49.2	1401.3	159.7
24 ore	505.6	67.1	392.7	52.2
72 ore	668.7	155.7	378.7	49.0

Tabelul 22 oferă o perspectivă detaliată asupra evoluției intensității fluorescenței în timp (1 minut, 24 ore și 72 ore) pentru două tipuri de platforme grafenice – GO-COOH și GO-COOH/EDC-NHS – incubate cu FAM-ssADN. Scopul acestei analize este de a evalua stabilitatea și eficiența interacțiunii oligonucleotidelor cu suprafața activată și neactivată a grafenei cu grupări carboxil.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

În cazul platformei GO-COOH/EDC-NHS, se observă o valoare inițială foarte ridicată a fluorescenței (1401,3 r.f.u. la 1 minut), indicând o prezență abundentă a FAM-ssADN liber sau doar slab legat la suprafața activată. Această fluorescență scade rapid în timp: la 24 de ore este de 392,7 r.f.u., iar la 72 de ore ajunge la 378,7 r.f.u., indicând o imobilizare eficientă a oligonucleotidelor prin formarea legăturilor covalente. Această scădere semnificativă a semnalului fluorescent poate fi atribuită fixării stabile a ADN-ului pe suprafața activată, care împiedică eliberarea acestuia în soluție. Totodată, valorile mici ale deviației standard (25,6 r.f.u. pentru E4, de exemplu) reflectă o uniformitate bună a procesului de legare.

În schimb, pentru platforma GO-COOH, tendința este opusă. Intensitatea fluorescenței crește treptat de la 380,8 r.f.u. (1 minut) la 505,6 r.f.u. (24 ore), și ulterior la 668,7 r.f.u. (72 ore). Acest comportament sugerează că interacțiunile dintre FAM-ssADN și suprafața GO-COOH sunt predominant fizico-chimice, de tip necovalent, și nu asigură o legare stabilă în timp. Pe măsură ce timpul de incubare crește, parte din ssADN se eliberează treptat în soluție, ceea ce se reflectă prin creșterea semnalului fluorescent. De asemenea, deviațiile standard sunt mai mari (de ex. 155,7 la 72 ore), indicând o variabilitate ridicată a gradului de legare, probabil cauzată de diferențe locale de densitate a funcționalizării sau de interacțiuni neuniforme.

Comparând cele două platforme, este evident că GO-COOH/EDC-NHS oferă o interacțiune inițială slabă, dar ulterior stabilă și eficientă, datorită formării legăturilor covalente prin reacția de activare cu EDC/NHS. Aceasta reduce semnificativ fluorescența liberă în mediu pe termen lung. În schimb, GO-COOH neactivate permite o adsorbție inițială moderată, dar instabilă, ceea ce duce la o eliberare graduală a ssADN, crescând astfel semnalul fluorescent detectat.

Aceste rezultate confirmă importanța activării chimice a grupărilor carboxilice din platformele GO-COOH pentru aplicații de bioconjugare, în special în contextul dezvoltării de biosenzori sau sisteme de livrare a materialului genetic, unde este esențială o fixare sigură și

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

predictibilă a oligonucleotidelor. Prin urmare, platformele GO-COOH/EDC-NHS reprezintă o opțiune superioară pentru stabilitatea și controlul interacțiunii cu moleculele biologice în timp.

II.2.1.3.2. Analize ale structurii chimice

Analiza prin intermediul spectroscopiei FTIR

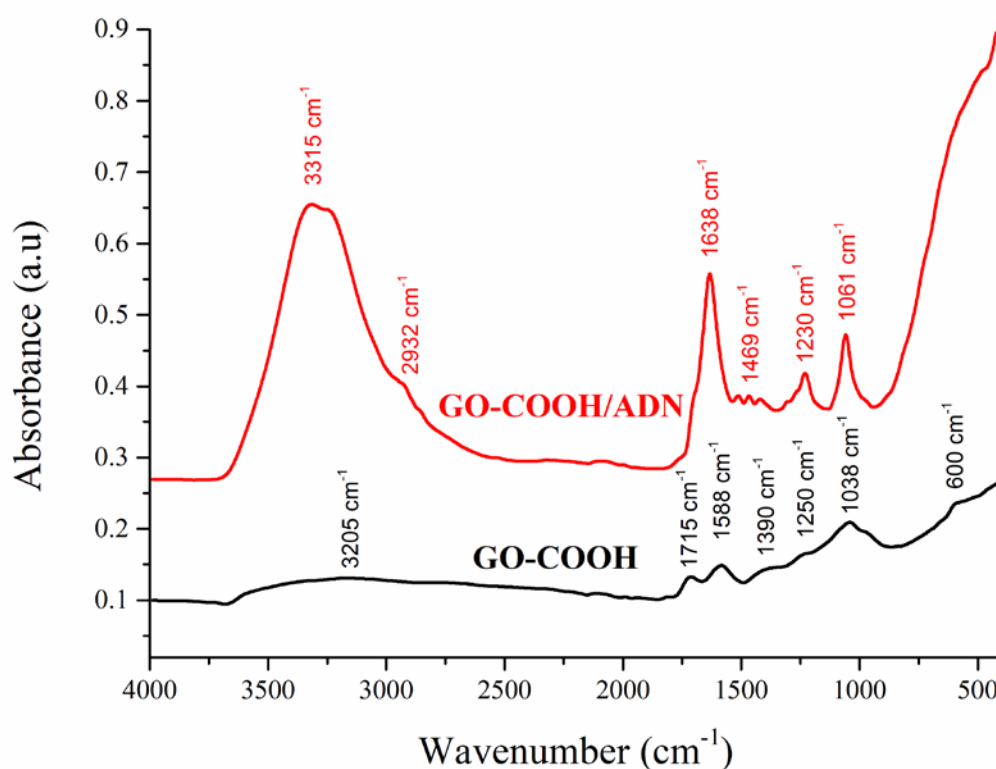


Figura 7. Spectre FTIR pentru GO-COOH (negru) și GO-COOH/EDC-NHS/FAM-ADN (roșu) după incubare în mediul complex

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

Spectroscopia FTIR a fost utilizată pentru a evidenția modificările chimice ale GO-COOH în urma incubării în mediul complex cu ADN, incluzând FAM-ssADN, BSA, ioni de magneziu (Mg^{2+}), SDS și Tris-HCl (Figura 7). Spectrul de referință al GO-COOH (linie neagră) a fost comparat cu cel obținut după incubare (linie roșie), cu scopul de a identifica noi benzi, deplasări spectrale și modificări care reflectă procesele de adsorbție și modificare chimică.

În spectrul inițial al GO-COOH, banda largă din regiunea $3200-3400\text{ cm}^{-1}$ este atribuită vibrațiilor de întindere O-H ale grupărilor carboxilice și hidroxicile de pe suprafața oxidului de grafenă. După incubare, această bandă devine vizibil mai intensă și ușor deplasată, ceea ce sugerează prezența de noi legături de hidrogen, formate între -OH din GO și grupările fosfat și aminele primare ale ADN-ului. În plus, contribuția aminoacizilor din BSA (precum lizina și arginina) și grupările -NH din oligonucleotide contribuie la suprapunerea semnalului, confirmând modificarea platformelor grafenice. Mai mult, banda de absorbție de la 2932 cm^{-1} nu se observă în GO-COOH simplu (linia neagră), dar devine clar vizibil după incubarea în mediu complex cu ADN (linia roșie). Prezența sa sugerează contribuția unor molecule alifatiche care conțin lanțuri CH_2 , cum este SDS, care conține un lanț dodecilic ($C_{12}H_{25}$) cu multiple grupări CH_2 , BSA care are lanțuri laterale de aminoacizi hidrofobi și AND care are, de asemenea, contribuții din riboză/dezoxiriboză [1].

Vibrația caracteristică a grupărilor carboxilice $C=O$ apare în jurul valorii de 1720 cm^{-1} în spectrul GO-COOH. După interacțiune, se observă o diminuare a intensității și o ușoară deplasare a benzii, fenomen care poate fi atribuit, pe de o parte, complexării ionilor Mg^{2+} cu grupările carboxilate, ceea ce perturbă distribuția electronică în jurul legăturii $C=O$. Pe de altă parte, aceste modificări pot reflecta formarea de punți ionice între GO-COOH și ADN, mediate de Mg^{2+} , care reduc densitatea de sarcină pe atomul de oxigen carbonilic și induc astfel deplasări spectrale detectabile prin FTIR.

După incubare, banda de absorbție de la 1638 cm^{-1} este interpretată ca rezultat al suprapunerii vibrației Amide I ($C=O$ stretching) caracteristice proteinelor precum BSA cu

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

vibrațiile rețelei grafenice, incluzând totodată contribuții din vibrațiile C=C ale bazelor azotate (timina, adenina) și N–H din guanină, precum și întinderile grupărilor O–H și N–H ale aminoacizilor, această regiune (împreună cu banda de la 1061 cm^{-1} , atribuită vibrației C–O din deoxiriboză) indicând o interacțiune biochimică complexă GO-COOH/EDC-NHS/FAM-ssADN [2].

Un alt aspect notabil îl reprezintă deplasarea benzii de la 1250 cm^{-1} la 1230 cm^{-1} după expunerea la ADN. Această regiune este asociată vibrațiilor C–O–C din grupările epoxidice sau eterice de pe GO, iar deplasarea sugerează interacțiuni de legătură de hidrogen sau electrostatice cu grupările fosfat ale ADN-ului. Efectul este amplificat de prezența ionilor Mg^{2+} , care pot acționa ca punți între grupările anionice ale ADN-ului și oxigenii de suprafață de pe GO. În mod similar, banda de la 1038 cm^{-1} , atribuită vibrațiilor de întindere C–O din acizii carboxilici și alcoolii GO-ului, suferă o deplasare pronunțată la 1061 cm^{-1} după incubare. Această schimbare evidențiază prezența vibrațiilor fosfatice (P–O–C și P=O) din ADN, dar și modificarea polarității locale ca urmare a formării de complexe GO- Mg^{2+} -ADN.

De asemenea, în spectrul probei funcționalizate apare o bandă suplimentară la 1469 cm^{-1} , absentă în GO-COOH simplu, atribuită vibrațiilor de deformare (scissor) ale grupărilor metil și metilen ($-\text{CH}_3$ și $-\text{CH}_2$). Această bandă reflectă cu claritate prezența SDS, precum și a componentelor alifactice din BSA, confirmând încorporarea lor eficientă în rețeaua de grafen oxidat.

Regiunea sub 1000 cm^{-1} prezintă vibrații specifice fosfaților, sulfatilor, și legăturilor C–H. Această regiune este adesea clasificată ca „zona de amprentă moleculară” și oferă informații importante despre structura fină și interacțiunile moleculare. Banda de absorbție din intervalul $920\text{--}980\text{ cm}^{-1}$ este atribuită fosfaților din structura ADN-ului, fiind asociată vibrațiilor asimetrice P–O–C din grupările fosfatice. Intensificarea acestor benzi indică adsorbția ADN-ului la suprafața GO și posibila formare de legături de hidrogen cu grupările -COOH sau -OH. Benzile din zona $850\text{--}900\text{ cm}^{-1}$ (C–H bending out-of-plane) sunt asociate vibrațiilor C–H din

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

afara planului, provenind fie din inelele aromatice ale GO-COOH, fie din structura bazelor purinice și pirimidinice ale ADN-ului. Modificările apărute în această regiune spectrală reflectă interacțiuni de tip π - π între GO-COOH și ADN, în special între planele aromatice ale grafenului și bazele azotate. Benzile din intervalul $750\text{--}850\text{ cm}^{-1}$, asociate vibrațiilor de întindere și torsiune ale legăturii S-O din SDS, sunt vizibile în această regiune. De asemenea, ADN-ul poate prezenta semnale torsionale caracteristice, provenite din inelele ribozice. În final regiunea $600\text{--}700\text{ cm}^{-1}$ ($\text{Mg}^{2+}\text{-O}$ & deformări aromatice), sunt adesea atribuite modificărilor de simetrie ale GO-COOH datorate complexării cu cationi divalenți (Mg^{2+}), precum și unor deformări din inelele aromatice cauzate de interacțiuni nespecifice.

Analiza prin intermediul spectroscopiei Raman

În cadrul acestui studiu, a fost investigată structura platformelor pe bază de oxid de grafenă carboxilat (GO-COOH) și a celor funcționalizate cu ADN marcat fluorescent (FAM-ADN), utilizând spectroscopie Raman. Măsurătorile au fost realizate cu două lungimi de undă de excitație (473 nm și 785 nm), în condiții variate de achiziție, pentru a evidenția influența funcționalizării chimice și a parametrilor spectroscopici asupra semnalului Raman. Valorile corespunzătoare poziției și intensității benzilor D și G, precum și raportul I_D/I_G , au fost extrase din fiecare spectru și centralizate în Tabelul 23, pentru a permite o analiză comparativă riguroasă între probe.

Figura 8 prezintă spectrele Raman înregistrate pentru platforma GO-COOH utilizând două lungimi de undă de excitație (473 nm și 785 nm), în condiții variate de achiziție. Spectrul (a), obținut cu o excitație de 473 nm, evidențiază clar benzile caracteristice GO-COOH [3, 4]: banda D (1361 cm^{-1}), asociată cu defectele structurale și dezordinea din rețea, și banda G ($\sim 1599\text{ cm}^{-1}$), corespunzătoare vibrațiilor modului E_{2g} al rețelei sp^2 , cu un raport I_D/I_G de 0.71, indicând un grad relativ moderat de defectare a structurii grafenice. De asemenea, se remarcă prezența clară a benzilor 2D (2700 cm^{-1}) și D+G (2952 cm^{-1}), specifice rețelelor stratificate de tip GO.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

În schimb, spectrele (b) și (c), obținute cu o excitație laser de 785 nm, arată deplasări evidente ale benzilor D și G către valori mai mici de deplasare Raman (D la $\sim 1320 \text{ cm}^{-1}$, G la $\sim 1588\text{--}1589 \text{ cm}^{-1}$), însoțite de o creștere a intensității relative a benzii D. Astfel, raportul I_D/I_G crește semnificativ la 1.2, sugerând fie o mai bună sensibilitate a acestei excitații la defectele structurale, fie o diferență de răspuns spectroscopic indusă de energia mai mică a fotonului incident (laser IR). Efectul cumulării achizițiilor este de asemenea observabil: în spectrul (c), obținut cu două achiziții, intensitatea generală este mai mare și benzile D și G sunt mai bine definite comparativ cu spectrul (b).

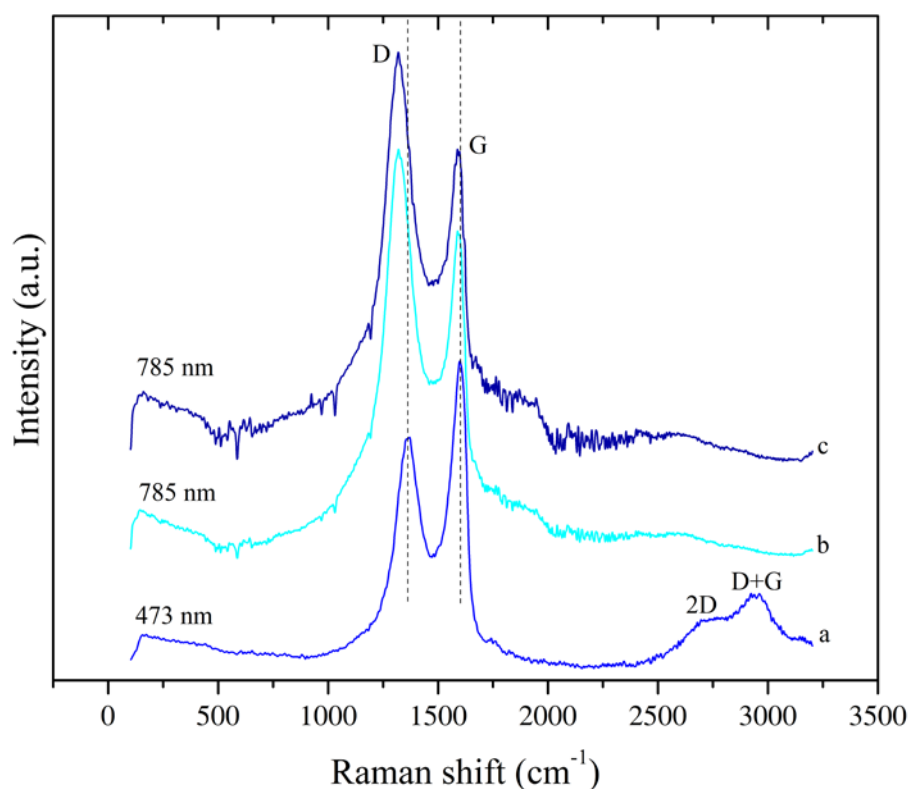


Figura 8. Spectrele Raman înregistrate pe platforma GO-COOH, utilizând (a) o excitație laser de 473 nm și o achiziție, (b) o excitație laser de 785 nm și o achiziție și (c) o excitație laser de 785 nm și două achiziții.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

Spectrele din Figura 9 indică o comportare diferită a platformei funcționalizate cu ADN în raport cu platforma GO-COOH simplă. Spectrele (a)–(c), toate obținute cu o excitație de 473 nm, dar cu număr diferit de achiziții sau din zone diferite ale probei, prezintă aceleași benzi caracteristice D și G, cu variații minore în intensitate, și ușor deplasate (banda D la ~ 1356 – 1359 cm^{-1} și banda G la ~ 1604 – 1605 cm^{-1}). Spectrul (b), care a fost înregistrat cu două achiziții, indică o creștere a intensității generale, dar păstrează proporții similare între benzile caracteristice, ceea ce sugerează o bună omogenitate a funcționalizării platformei. Valorile raportului I_D/I_G variază între 0.74 și 0.95, arătând o ușoară creștere a defectării rețelei sp^2 în urma funcționalizării chimice. Acest lucru este de așteptat, având în vedere că reacția de cuplare EDC-NHS determină modificări covalente în structura GO, prin formarea de legături amidice între grupările carboxil de pe material și grupările amino din structura ADN.

Pentru spectrele înregistrate cu excitație de 785 nm, se observă din nou deplasarea semnificativă a benzii D către valori mai mici (1314 – 1320 cm^{-1}) și o bandă G în jur de 1593 – 1599 cm^{-1} . Raportul I_D/I_G se menține la 1.03 în ambele cazuri (d și e), ceea ce sugerează un grad ridicat al defectelor structurale, similar cu cel observat pentru GO-COOH nefuncționalizat la 785 nm. Totuși, valorile mult mai mari ale intensităților absolute reflectă eficiența semnalului în condiții de excitație IR și acumulări multiple.

Spectrul (e), obținut pe platforma GO-COOH/EDC-NHS/FAM-ADN cu excitație 785 nm și două achiziții, se remarcă prin intensități semnificativ mai mari comparativ cu celelalte spectre și prin o modificare vizibilă a formei și poziției benzilor D și G. Banda D este centrată la 1314.53 cm^{-1} , iar banda G la 1593.38 cm^{-1} , cu un raport I_D/I_G de 1.03. Deși acest raport este comparabil cu cel obținut pentru aceeași platformă în spectrul (d), forma și amplitudinea semnalului diferă substanțial. Această anomalie spectrală poate fi explicată prin influența fluoroforului carboxifluoresceină atașat la molecula de ADN.

FAM este cunoscut ca fiind un fluorofor cu absorbție în regiunea verde ($\sim 495\text{ nm}$) și emisie în galben ($\sim 520\text{ nm}$) [5], dar care poate prezenta interacțiuni nespecifice cu suprafețele

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

carbonice, în special în condiții de excitație Raman în infraroșu apropiat (785 nm), unde fluorescența reziduală poate interfera cu semnalul Raman, mai ales la intensități mari de expunere și achiziții multiple [6]. Chiar dacă emisia FAM nu se suprapune direct peste benzile D și G, efectele de fundal fluorescente pot distorsiona forma și intensitatea semnalului Raman înregistrat, mai ales în condiții de cumulări repetate. Acest lucru poate explica pantele mai abrupte și o bază spectrală ridicată în zona analizată. În plus, interacțiunile dintre fluorofor și suprafața GO pot conduce la modificări ale polarizabilității locale, ceea ce afectează intensitatea modurilor Raman active. Aceste interacțiuni sunt cunoscute în literatura de specialitate și pot produce amplificări selective sau diminuări ale semnalului [7].

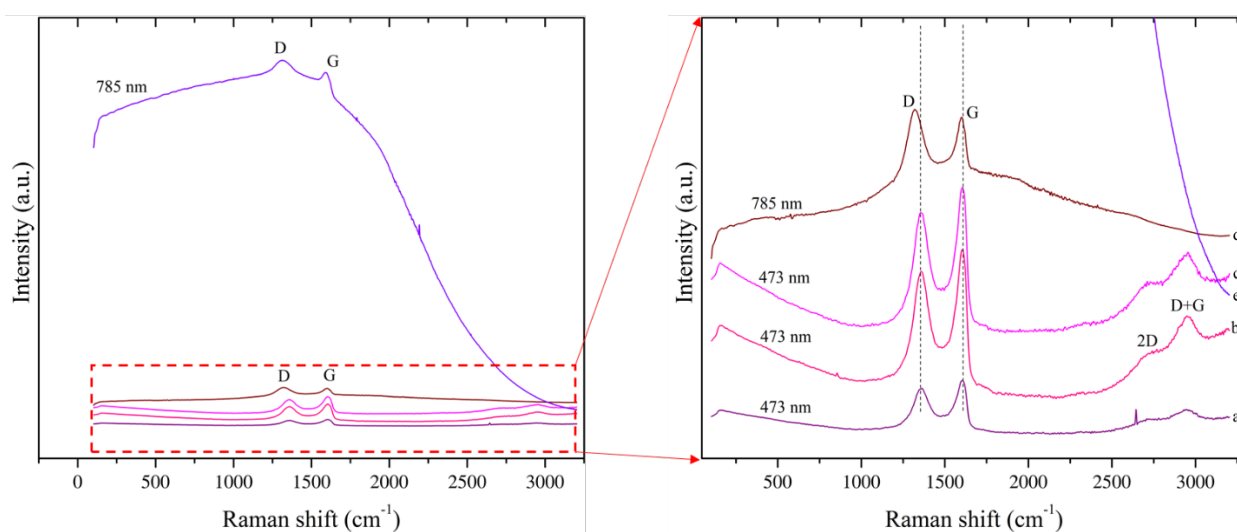


Figura 9. Spectrele Raman înregistrate pe platforma GO-COOH/EDC-NHS/FAM-ADN, utilizând (a) o excitație laser de 473 nm și o achiziție – zona 1, (b) o excitație laser de 473 nm și două achiziții – zona 2, (c) o excitație laser de 473 nm și o achiziție – zona 3, (d) o excitație laser de 785 nm și o achiziție, (e) o excitație laser de 785 nm și două achiziții.

Figura 10 compară direct spectrul platformei GO-COOH (a) și cel al platformei funcționalizate GO-COOH/EDC-NHS/FAM-ADN (b), ambele înregistrate cu excitație de 473 nm. În urma funcționașării, se remarcă o creștere clară a intensității benzii D și o deplasare ușoară spre valori mai mari a benzii G, ceea ce poate fi interpretat ca efectul unei modificări

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

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

Codul proiectului: 213

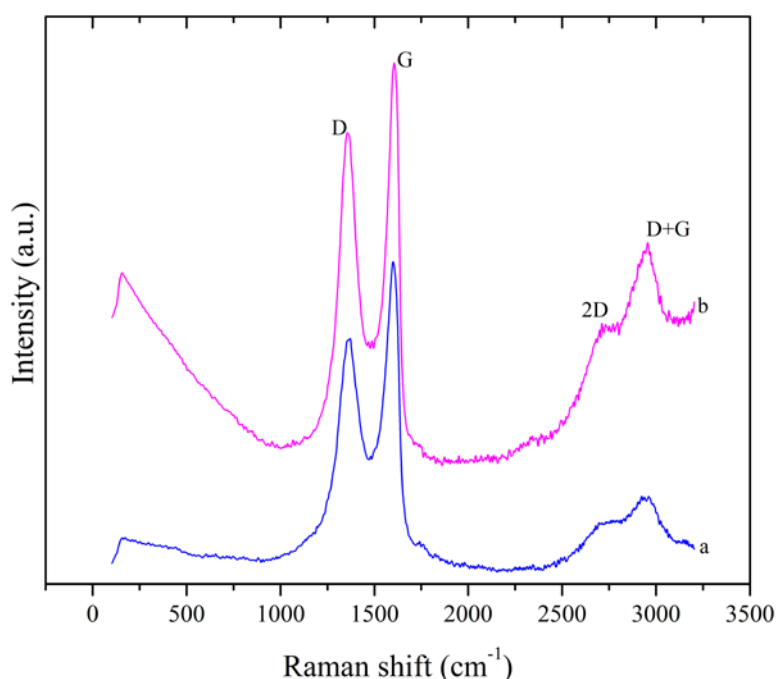
Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

chimice a suprafeței GO-COOH și al interacțiunii cu structura ADN-ului marcat. Prezența semnalelor 2D și D+G bine conturate în proba funcționalizată indică păstrarea parțială a ordinii structurale, dar și o influență asupra modului de organizare a straturilor, probabil datorată atașării biomoleculelor și a interacțiunii acestora cu nanostructura GO-COOH. Prezența ADN-ului marcat fluorescent ar putea contribui și la intensificarea anumitor componente spectrale prin efecte de rezonanță.

Funcționalizarea chimică s-a realizat prin reacția de activare a grupărilor carboxilice cu EDC și NHS, care formează intermediarul stabil NHS-ester, urmat de formarea de legături covalente cu grupările amino de pe molecula de ADN. Acest proces determină nu doar modificări structurale în oxidul de grafenă, ci și apariția de noi moduri vibraționale detectabile în spectrele Raman. Diferențele de poziție și intensitate ale benzilor între spectrele înregistrate la 473 și 785 nm sugerează că tipul de excitație influențează modul în care sunt detectate aceste modificări, posibil prin rezonanță selectivă cu unele niveluri energetice sau fluorescență reziduală.



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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

Figura 10. Spectrele Raman înregistrate cu o excitație laser de 473 nm pe platformele (a) GO-COOH și (b) GO-COOH/EDC-NHS/FAM-ADN.

Tabel 23. Valorile înregistrate pe axele X și Y corespunzătoare pozițiilor benzilor D și G, și raportul intensităților benzilor I_D/I_G .

Proba	D		G		I_D/I_G
	X (cm^{-1})	Y (u.a.)	X (cm^{-1})	Y (u.a.)	
GO-COOH (a)	1361.93	9385.79	1599.02	13129.0	0.71
GO-COOH (b)	1320.48	23495.79	1589.24	19447.36	1.2
GO-COOH (c)	1319.08	28225.89	1588.33	23477.26	1.2
GO-COOH + ADN (a)	1355.53	-7032.68	1603.55	-5994.16	0.95
GO-COOH + ADN (b)	1358.66	8651.89	1604.80	11593.06	0.74
GO-COOH + ADN (c)	1356.86	16537.09	1605.78	19929.35	0.82
GO-COOH + ADN (d)	1320.79	30393.66	1599.95	29308.67	1.03
GO-COOH + ADN (e)	1314.53	401840.52	1593.38	388030.51	1.03

II.2.1.4. Concluzii

În cadrul acestui studiu, a fost demonstrată capacitatea platformelor grafenice carboxilate (GO-COOH) de a adsorbi eficient oligonucleotide marcate fluorescent (FAM-ssADN), atât în mod natural, prin interacțiuni non-covalente, cât și în mod controlat, prin funcționalizare chimică cu EDC-NHS. Rezultatele obținute prin spectroscopie de fluorescență indică o diferență semnificativă între cele două tipuri de legare: în timp ce GO-COOH simplu asigură o adsorbție instabilă și reversibilă, platformele activate chimic oferă o fixare covalentă mai stabilă, reproductibilă și predictibilă.

Analizele FTIR au evidențiat modificări spectrale majore în urma incubării în mediu complex, incluzând deplasarea benzilor caracteristice grupărilor C=O, C–O–C și C–O, apariția de benzi noi asociate cu prezența SDS și BSA, precum și intensificarea vibrațiilor atribuite bazelor azotate și fosfaților din structura ADN-ului. În special, shifturile de la 1250 cm^{-1} la

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

1230 cm^{-1} și de la 1038 cm^{-1} la 1061 cm^{-1} , precum și apariția benzii la 1469 cm^{-1} , confirmă interacțiuni chimice și structurale directe între suprafața GO-COOH și biomoleculele incubate.

Spectroscopia Raman a completat această caracterizare, evidențiind modificări în pozițiile și intensitățile benzilor D și G, cu variații ale raportului ID/IG, semnalând o creștere a defectării locale a rețelei GO în urma funcționalizării chimice și interacțiunii cu ADN-ul. Diferențele observate între excitațiile cu 473 nm și 785 nm sugerează că prezența fluoroforului FAM influențează modul de răspuns spectroscopic prin efecte de fluorescență reziduală.

În ansamblu, rezultatele obținute demonstrează că platformele GO-COOH pot fi eficient funcționalizate și utilizate pentru legarea specifică și stabilă a oligonucleotidelor în medii biologice complexe. Aceste platforme prezintă un potențial semnificativ pentru aplicații în livrarea controlată de material genetic, biosenzori moleculari și terapii personalizate pentru boli precum mielomul multiplu.

II.2.1.5. Bibliografie

[1] Loredana Elena Olar, Vasile Daniel Tomoiagă, Sorin Marian Mârza, Ionel Papuc, Ioan Florin Beteg, Petru Cosmin Peștean, Mihai Musteață, Caroline Maria Lăcătuș, Raluca Marica, Paula Maria Pașca, Robert Cristian Purdoi & Radu Lăcătuș. (2024) Computed Tomography and Fluorescence Spectroscopy Blood Plasma Analysis Study for Kynurenic Acid as a Diagnostic Approach to Chronic Coenurosis in Sheep. Life 14:9, pages 1121.

[2] Dodi, Gianina, Diana Popescu, Florina Daniela Cojocar, Mihaela Aradoaei, Romeo Cristian Ciobanu, and Cosmin Teodor Mihai. 2022. "Use of Fourier-Transform Infrared Spectroscopy for DNA Identification on Recycled PET Composite Substrate" Applied Sciences 12, no. 9: 4371. <https://doi.org/10.3390/app12094371>

[3] Vasile, E., Pandele, A.M., Andronescu, C. et al. Hema-Functionalized Graphene Oxide: a Versatile Nanofiller for Poly(Propylene Fumarate)-Based Hybrid Materials. Sci Rep 9, 18685 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55081-2>

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

[4] Onaș AM, Bîru IE, Gârea SA, Iovu H. Novel Bovine Serum Albumin Protein Backbone Reassembly Study: Strongly Twisted β -Sheet Structure Promotion upon Interaction with GO-PAMAM. *Polymers*. 2020; 12(11):2603. <https://doi.org/10.3390/polym12112603>

[5] AAT Bioquest, Inc. (2025, May 23). Quest Graph™ Spectrum [FAM (Carboxyfluorescein)]. AAT Bioquest. https://www.aatbio.com/fluorescence-excitation-emission-spectrum-graph-viewer/fam_carboxyfluorescein.

[6] Tuschel, David. "Selecting an excitation wavelength for Raman spectroscopy." (2016): 14-23.

[7] Cortijo-Campos S, Ramírez-Jiménez R, de Andrés A. Raman and Fluorescence Enhancement Approaches in Graphene-Based Platforms for Optical Sensing and Imaging. *Nanomaterials*. 2021; 11(3):644. <https://doi.org/10.3390/nano11030644>

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

PARTEA a III-a

III.1. CAPITOL 1

III.1.1. Optimizarea formulărilor pe bază de gelatină, CNF și K-carragenan și a parametrilor de printare

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

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

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

III.1.1.1. Introducere

În contextul necesității de a dezvolta soluții avansate pentru regenerarea țesutului osos afectat de afecțiuni grave precum mielomul multiplu, cercetarea biomedicală se îndreaptă tot mai mult către tehnologii emergente, precum printarea 3D, în combinație cu materiale biocompatibile de înaltă performanță. Proiectul REOSTEOMI-Advanced & Personalized Solutions for Bone Regeneration and Complications Associated with Multiple Myeloma își propune să răspundă acestor provocări prin conceperea și realizarea de substituenți osoși personalizați, capabili să ofere suport structural, integrare biologică și, atunci când este necesar, funcționalități terapeutice suplimentare.

În acest scop, activitățile desfășurate s-au concentrat pe dezvoltarea și optimizarea unor formulări bioactive printabile, adaptate tehnologiei de extrudare la temperaturi blânde, compatibile cu mediul biologic. S-au utilizat materiale naturale precum gelatina, κ-carragenanul și nanofibrele de celuloză, care oferă proprietăți reologice și mecanice adecvate, dar și un mediu favorabil pentru interacțiunea cu celulele. Toate aceste eforturi au fost însoțite de studii detaliate privind optimizarea formulărilor printabile și a parametrilor de printare,

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

astfel încât procesul să asigure un control cât mai precis asupra arhitecturii scaffoldurilor, stabilitatea lor în mediul biologic și integrarea eficientă în țesutul osos țintă.

III.1.1.2. Materiale și sinteză

Materiale utilizate

Gelatina obținută din piele de pește, k-carragenan, clorura de calciu și genipinul au fost achiziționate de la Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, SUA). Nanofibrele de celuloză au fost achiziționate de la Novarials (USA).

Sinteza formulărilor printabile

Acest raport prezintă sinteza și pregătirea unor formulări printabile, destinate studiului de optimizare a vâscozității hidrogelurilor și a parametrilor de printare 3D, pe baza datelor experimentale prezentate în tabelele de mai jos. Formulările printabile sunt codificate cu denumirea GCK, aceasta reprezentând baza de pornire a compoziției, urmată de etapele de optimizare a concentrațiilor (Tabelul 24).

Tabelul 24. Primele concentrațiile utilizate în realizarea formulărilor printabile.

COD	Gelatină	Nanofibre de celuloză	K- carragenan	Clorură de calciu	Genipin
GCK	18%	6%	8%	2%	0.1%

Pentru prima formulare printabilă s-au cântărit:

- 0.8 g κ-carragenan,
- 2 g gelatină,
- 0.6 g nanofibre de celuloză,

care au fost adăugate treptat în 10 mL de apă, în ordinea menționată. Temperatura a fost menținută constantă la 40 °C, pentru a facilita solubilizarea gelatinei în soluția conținând

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

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.

Formulările obținute au fost ulterior printate 3D conform parametrilor prezentați în Tabelul 2. Pentru stabilizarea finală a structurilor, fiecare probă a fost reticulată în două etape:

1. Reticulare cu soluție de clorură de calciu 2%, timp de 10 minute,
2. Reticulare cu soluție de genipin 0.1%, timp de 24 de ore.

Probele astfel reticulate au fost apoi înghețate și pregătite pentru liofilizare.

Printarea formulărilor sintetizate

Printarea formulărilor sintetizate a fost realizată utilizând imprimanta CELLINK, prin tehnica extrudării prin presiune.

Pentru testare, s-au utilizat capete de printare (ace) cu diametre diferite:

- 22G (aproximativ 0.41 mm),
- 25G (aproximativ 0.26 mm),
- 27G (aproximativ 0.21 mm),

în vederea determinării configurației optime care să asigure o extrudare uniformă și fidelitate geometrică cât mai ridicată față de modelul 3D de referință (un pătrat). În funcție de formularea hidrogelului utilizat, s-au ajustat parametrii de printare, precum presiunea și viteza de extrudare, pentru a evalua influența acestora asupra calității și stabilității structurilor printate.

III.1.1.3. Rezultate și discuții

Rezultatele printării 3D sunt prezentate în tabelele de mai jos. Acestea prezintă rezultatele experimentului privind parametrii de printare și fidelitatea acestora, evidențiind variațiile în dimensiuni, presiune, viteză, și observațiile legate de calitatea printării.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

Tabelul 25 evidențiază performanța formulării GCK (martor), care servește ca probă de referință. Prima formulare testată (Set 1) nu a permis realizarea printării în parametrii optimi. În consecință, sinteza a fost reluată, utilizând concentrații variate ale componentelor, cu scopul de a identifica formula optimă care să permită o printare corespunzătoare și obținerea unor suporturi 3D cât mai apropiate de modelul de referință, aceste rezultate fiind prezentate în următoarele tabele.

Tabelul 25. Optimizarea parametrilor de printare pentru compoziția GCK1 (martor).

GCK1 (control)			
Concentrații: 20% Gelatină/6% Nanofibre celuloză/8% K-carragenan			
Nr. Crt	Parametrii de printare	Imagini printare	Observații printare
<i>Set 1</i>			
1	Dimensiunile selectate: 10x10x1 mm Diametrul acului de printare: 22G Procentul de umplere: 32% Temperatură: 40°C Presiune: 260 kPa Viteza de printare: 10 mm/s		<i>Am ales să începem prin a printa în doar câteva straturi pentru a determina eficiența parametrilor selectați. Fidelitatea de printare pentru prima probă a fost foarte scăzută, obținându-se un suport încărcat de material, fără pori vizibili.</i>

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

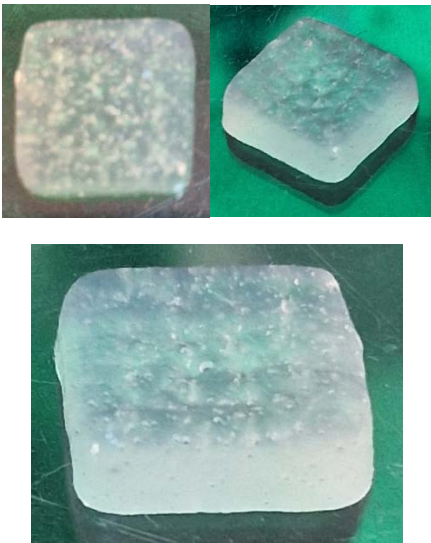
Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

2	Dimensiunile selectate: 10x10x1 mm Diametrul acului de printare: 22G Procentul de umplere: 32% Temperatură: 40°C Presiune: 250kPa Viteza de printare: 10 mm/s		<i>Scăderea presiunii de extrudare a condus la formarea unor suporturi cu pori vizibil încărcăți dar totuși cu o printabilitate mai adecvată.</i>
3	Dimensiunile selectate: 10x10x1 mm Diametrul acului de printare: 22G Procentul de umplere: 32% Temperatură: 40°C Presiune: 240 kPa Viteza de printare: 10 mm/s		<i>Scăderea presiunii de extrudare la 240 kPa a condus la formarea unor suporturi cu pori vizibil încărcăți, dar totuși cu o printabilitate mai adecvată.</i>

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

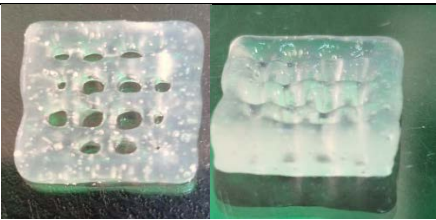
Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

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: 10x10x1 mm Diametrul acului de printare: 22G Procentul de umplere: 32% Temperatură: 40°C Presiune: 230 kPa Viteza de printare: 10 mm/s		<i>Scăderea presiunii de extrudare la 230 kPa a condus la formarea unor suporturi cu pori semi-încărcați (ovalii) dar totuși cu o printabilitate mai adecvată și mai apropiată de modelul de referință.</i>
5	Dimensiunile selectate: 10x10x1 mm Diametrul acului de printare: 22G Procentul de umplere: 32% Temperatură: 40°C Presiune: 220 kPa Viteza de printare: 10 mm/s		<i>Scăderea presiunii de extrudare la 220 kPa a condus la formarea unor suporturi cu pori semi-încărcați (ovalii), dar cu o printabilitate mai adecvată și mai apropiată de modelul de referință.</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 – 18

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

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 Diametrul acului de printare: 22G Procentul de umplere: 32% Temperatură: 40°C Presiune: 210 kPa Viteza de printare: 10 mm/s		<i>Scăderea presiunii de extrudare la 210 kPa a condus la formarea unor suporturi cu pori parțial umpluți (de formă ovală), dar cu o printabilitate mai adecvată și mai apropiată de modelul de referință.</i> <i>Totuși, s-au observat întreruperi ale fluxului de material, vizibile la nivelul suporturilor, cauzate de prezența porilor dubli la baza acestora.</i>
7	Dimensiunile selectate: 10x10x1 mm Diametrul acului de printare: 22G Procentul de umplere: 32% Temperatură: 40°C Presiune: 200 kPa Viteza de printare: 10mm/s		<i>Scăderea presiunii de extrudare a condus la obținerea unor suporturi cu pori ovali, parțial umpluți cu material.</i> <i>Se observă în continuare prezența unor straturi neimprimabile, în care filamentul nu a fost extrudat corespunzător, ca urmare a unei viteze</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

			de printare neadecvate, deși depunerea primului strat a fost realizată corect. De asemenea, structura tinde să colapseze sub propria greutate, semnalând o consistență insuficientă a materialului pentru menținerea stabilității geometrice.
8	Dimensiunile selectate: 10x10x1 mm Diametrul acului de printare: 22G Procentul de umplere: 32% Temperatură: 40°C Presiune: 200 kPa Viteza de printare: 12mm/s		În acest caz, viteza de printare a fost crescută la 12 mm/s, menținându-se presiunea constantă la 200 kPa. Se poate observa că porii structurilor imprimate sunt mai puțin încărcăți cu material, ceea ce indică un transfer redus de material în timpul extrudării.

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

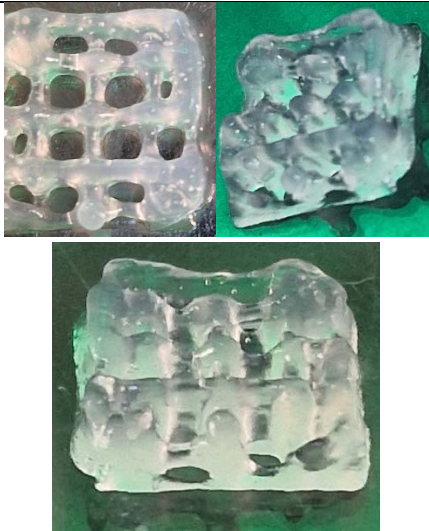
Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

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: 10x10x1 mm Diametrul acului de printare: 22G Procentul de umplere: 32% Temperatură: 40°C Presiune: 190 kPa Viteza de printare: 12mm/s		<i>Scăderea presiunii de extrudare la 190 a condus la obținerea unor suporturi cu pori aproape pătrați.</i> <i>Totuși, după cum se poate observa, straturile de material sunt discontinue, indicând faptul că filamentul extrudat nu a fost continuu pe parcursul printării.</i>
10	Dimensiunile selectate: 10x10x1 mm Diametrul acului de printare: 22G Procentul de umplere: 32% Temperatură: 40°C Presiune: 180 kPa Viteza de printare: 12mm/s		<i>Scăderea presiunii de extrudare la 180 kPa a condus la obținerea unor suporturi cu pori interiori colapsați, în care straturile de material sunt discontinue din cauza întreruperii fluxului de filament.</i>

Rezultatele obținute pentru formulările printabile din tabelul anterior, având compoziția de 20% gelatină, 6% nanofibre de celuloză și 8% k-carragenan, evidențiază, în urma variației parametrilor de printare, o relație directă între presiunea de extrudare, viteza de printare și

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

fidelitatea structurii printate. Pe parcursul celor zece probe, s-au menținut constante dimensiunile suportului (10 x 10 x 1 mm) și diametrul acului de extrudare (22G), iar variațiile au fost aduse în special asupra presiunii și vitezei de printare.

În primele experimente (probele 1-3), presiunea ridicată (260-240 kPa) a determinat o extrudare excesivă a formulării printabile, ceea ce a condus la obținerea unor structuri încărcate, lipsite de porozitate vizibilă. Pe măsură ce presiunea a fost redusă progresiv (probele 4-6), s-a observat o îmbunătățire a printabilității și o apropiere de modelul de referință, cu pori semi-încărcați și o distribuție mai clară a materialului. Totuși, începând cu 210 kPa, au apărut primele semne ale întreruperii fluxului, indicând o limită inferioară critică a presiunii pentru o extrudare continuă și eficientă.

Reducerea presiunii la 200 kPa (proba 7) a generat structuri instabile, cu zone discontinue neprintate și tendință de colaps, ceea ce indică faptul că, în ciuda unei depuneri corecte a primului strat, viteza de printare (10 mm/s) și consistența formulării printabile nu au fost suficiente pentru menținerea stabilității geometrice. În proba 8, o modificare suplimentară creșterea vitezei la 12 mm/s a redus și mai mult cantitatea de material transferată, accentuând problemele de subextrudare.

Probele 9 și 10, cu presiuni scăzute (190-180 kPa) și viteză crescută (12 mm/s), au arătat o degradare semnificativă a fidelității printării: pori aproape pătrați dar discontinui, flux de material întrerupt și colaps structural. Aceste efecte indică un dezechilibru între presiune și viteză, în care materialul nu poate fi extrudat suficient de rapid și uniform pentru a susține o structură coerentă.

Se evidențiază faptul că, pentru parametrii studiați, zona optimă de printabilitate se situează în jurul unei presiuni de 230-220 kPa și o viteză de 10 mm/s, condiții în care s-au obținut structuri cu pori semi-încărcați și o geometrie relativ stabilă, însă a fost necesară optimizarea concentrațiilor de polimer. În acest sens, în Tabelul 26 sunt prezentate printările

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

realizate după ajustarea compoziției, utilizând 1.2 g gelatină, 0.2 g k-carragenan și 0.2 g nanofibre de celuloză dizolvate în 15 mL de apă.

Tabelul 26. Optimizarea parametrilor de printare pentru compoziția GCK2.

GCK2			
Concentrații: 8% Gelatină/1.5% Nanofibre celuloză/1.5% K-carragenan			
Nr. Crt	Parametrii de printare	Imagini printare	Observații printare
Set 2			
1	Dimensiunile selectate: 10x10x1 mm Diametrul acului de printare: 22G Procentul de umplere: 32% Temperatură: 40°C Presiune: 60kPa Viteza de printare: 10 mm/s		<i>Fidelitatea de printare pentru prima probă a fost foarte scăzută, obținându-se un suport încărcat de material, fără pori vizibil.</i>
2	Dimensiunile selectate: 10x10x1 mm Diametrul acului de printare: 22G Procentul de umplere: 32% Temperatură: 40°C Presiune: 50kPa		<i>Scăderea presiunii de extrudare a condus la formarea unor suporturi cu pori vizibil încărcăți.</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: 10 mm/s		
3	Dimensiunile selectate: 10x10x1 mm Diametrul acului de printare: 22G Procentul de umplere: 32% Temperatură: 40°C Presiune: 40kPa Viteza de printare: 8 mm/s		<i>Scăderea presiunii de extrudare la 40 kPa a condus la formarea unor suporturi cu pori vizibil încărcați.</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: 10x10x1 mm Diametrul acului de printare: 25G Procentul de umplere: 18% Temperatură: 40°C Presiune: 40 kPa Viteza de printare: 8 mm/s		<i>Schimbarea vârfului de printare a condus la formarea unor suporturi cu dimensiuni mai apropiate de modelul de referință, însă porii au rămas încărcați.</i>
5	Dimensiunile selectate: 10x10x1 mm Diametrul acului de printare: 25G Procentul de umplere: 18% Temperatură: 40°C Presiune: 30 kPa Viteza de printare: 10 mm/s		<i>Reducerea presiunii a condus la obținerea unor suporturi cu forme distorsionate și discontinue, cu pori semi-încărcați și de formă ovală.</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 Diametrul acului de printare: 25G Procentul de umplere: 18% Temperatură: 40°C Presiune: 20kPa Viteza de printare: 10 mm/s		<i>Scăderea presiunii a condus la obținerea unui contur și a unor pori apropiați de modelul de referință, însă se poate observa prezența unor pori lipsă și a unor straturi neimprimare, ca urmare a unei extrudări insuficiente generate de presiunea scăzută.</i>
7	Dimensiunile selectate: 10x10x1 mm Diametrul acului de printare: 25G Procentul de umplere: 18% Temperatură: 40°C Presiune: 10 kPa Viteza de printare: 10mm/s		<i>Reducerea presiunii la 10 kPa nu a condus la formarea unui suport, din cauza întreruperii fluxului de material, cauzată de blocarea acului și a extrudării necontinue a filamentului. Acest rezultat indică faptul că o presiune atât de scăzută nu este suficientă pentru a asigura o depunere constantă și coerentă a 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

			<i>compromițând complet procesul de printare.</i>
--	--	--	---

Comparativ cu formularea anterioară, care conținea o concentrație ridicată de 20% gelatină, 6% nanofibre de celuloză și 8% k-carragenan, noua compoziție cu 8% gelatină, 1.5% nanofibre de celuloză și 1.5% k-carragenan prezintă o vâscozitate semnificativ redusă. Această ajustare a permis explorarea unui interval mai larg de presiuni de extrudare, coborând până la 10 kPa, ceea ce anterior nu era posibil din cauza fluxului insuficient sau al blocajelor frecvente ale acului.

La presiuni de 60 kPa și 50 kPa, printările obținute au prezentat o fidelitate structurală scăzută, cu suporturi încărcate de material, fără pori vizibili. Aceste rezultate indică faptul că, deși extrudarea a fost facilitată, cantitatea de material depusă a fost excesivă pentru geometria dorită, conducând la colapsul porozității structurii.

Scăderea presiunii la 40 kPa și reducerea vitezei de printare la 8 mm/s nu au adus îmbunătățiri semnificative. Structurile obținute continuă să prezinte pori încărcăți, semn că, în ciuda ajustării vitezei, jetul format din formularea printabilă nu a fost suficient de bine controlat. Acest comportament poate fi explicat printr-o consistență încă relativ crescută a formulării printabile și prin diametrul mare al acului utilizat (22G), care limitează debitul formulării printabile extrudate. Pentru a îmbunătăți fidelitatea geometrică, s-a utilizat un ac mai subțire (25G), concomitent cu reducerea procentului de umplere la 18%. Aceste modificări au condus la o geometrie mai apropiată de modelul de referință, însă porii au rămas încărcăți, ceea

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

ce confirmă faptul că, deși optimizările fizice au fost benefice, compoziția formulării printabile încă influențează negativ controlul extrudării.

La presiuni mai reduse, de 30 kPa și 20 kPa, structurile obținute au prezentat forme distorsionate, pori ovali, semi-încărcați și straturi discontinue. Aceste fenomene se datorează insuficienței presiunii de extrudare, care nu mai este capabilă să susțină un flux constant și coerent al formulării printabile, în special pentru compozițiile cu o minimă vâscozitate reziduală. Reducerea presiunii până la 10 kPa a compromis complet procesul de printare. Nu s-a reușit formarea unui suport coerent, din cauza întreruperii continue a filamentului și blocării acului, ceea ce demonstrează că sub acest prag, forța de extrudare nu mai poate învinge rezistența materialului la curgere.

Prin urmare, se poate concluziona că noua formulare, cu o vâscozitate redusă, permite operarea la presiuni semnificativ mai mici decât cea anterioară, însă printabilitatea rămâne dependentă de echilibrul fin între parametrii operaționali presiune, viteză de printare și diametrul acului. Rezultatele obținute indică necesitatea identificării unei ferestre optime de parametri pentru această compoziție, posibil în intervalul 30-40 kPa, utilizând un ac cu un diametru mai mic. De asemenea, aceste teste confirmă importanța unei caracterizări reologice riguroase pentru corelarea vâscozității cu comportamentul de printare, în vederea asigurării unei extrudări coerente și a unei fidelități geometrice ridicate. Astfel, s-a continuat optimizarea concentrațiilor și a parametrilor de printare, după cum se poate observa în tabelul 27. Cantitățile de polimer (1,2 g gelatină, 0,2 g k-carragenan și 0,2 g nanofibre de celuloză) pentru formularea GCK3 au rămas neschimbate, însă a fost modificată cantitatea de apă (10 mL) în care acestea au fost dizolvate.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

Tabelul 27. Optimizarea parametrilor de printare pentru compoziția GCK3.

GCK3			
Concentrații: 12% Gelatină/2% Nanofibre celuloză/2% K-carragenan			
Nr. Crt	Parametrii de printare	Imagini printare	Observații printare
Set 3			
1	Dimensiunile selectate: 10x10x1 mm Diametrul acului de printare: 25G Procentul de umplere: 18% Temperatură: 40°C Presiune: 80kPa Viteza de printare: 6mm/s		<i>Fidelitatea de printare pentru prima probă a fost foarte scăzută, obținându-se un suport încărcat de material, fără pori foarte încărcăți de material.</i>
2	Dimensiunile selectate: 10x10x1 mm Diametrul acului de printare: 25G Procentul de umplere: 18% Temperatură: 40°C Presiune: 80kPa Viteza de printare: 8 mm/s		<i>Creșterea vitezei de printare a condus la formarea unor suporturi cu pori la fel de încărcăți ca în proba anterioară, însă cu o formă a suportului mai apropiată de modelul de referință.</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 – 18

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

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: 10x10x1 mm Diametrul acului de printare: 25G Procentul de umplere: 18% Temperatură: 40°C Presiune: 80kPa Viteza de printare: 10 mm/s		<i>Creșterea vitezei de printare a condus la formarea unui suport cu formă neregulată și pori dezordonați, indicând că materialul nu a fost depus uniform. Filamentul a fost discontinuu datorită vitezei de printare.</i>
4	Dimensiunile selectate: 10x10x1 mm Diametrul acului de printare: 25G Procentul de umplere: 18% Temperatură: 40°C Presiune: 60kPa Viteza de printare: 6 mm/s		<i>Reducerea presiunea și a vitezei de printare a condus la formarea unui suport cu pori vizibili, sem-mi încărcați și ovali.</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: 10x10x1 mm Diametrul acului de printare: 25G Procentul de umplere: 18% Temperatură: 40°C Presiune: 60 kPa Viteza de printare: 8 mm/s		<i>Creșterea vitezei de printare pentru această presiune a condus la formarea unui suport cu pori ovali, neîncărcați cu material, în care liniile modelului de referință sunt vizibile.</i>
6	Dimensiunile selectate: 10x10x1 mm Diametrul acului de printare: 25G Procentul de umplere: 18% Temperatură: 40°C Presiune: 60kPa Viteza de printare: 10 mm/s		<i>Creșterea vitezei de printare la 10 mm/s pentru această presiune a condus la formarea unui suport cu pori semi-ovalii, neîncărcați cu material. Totuși, se poate observa că, datorită creșterii vitezei, filamentul din interiorul perilor este discontinuu, indicând întreruperi în fluxul materialului și, implicit, o formulare cu printabilitate redusă.</i>

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

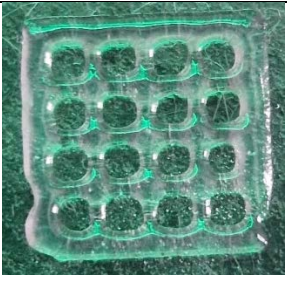
Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – 18

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

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: 10x10x1 mm Diametrul acului de printare: 25G Procentul de umplere: 18% Temperatură: 40°C Presiune: 50 kPa Viteza de printare: 8mm/s		<i>Reducerea presiunii la 50 kPa a condus la formarea unui suport cu pori dreapți, modelul fiind foarte apropiat de cel de referință. În schimb, datorită vitezei de printare de 8 mm/s, se pot observa în continuare discontinuități ale filamentului, liniile din interiorul suportului nefiind complete.</i>
8	Dimensiunile selectate: 10x10x1 mm Diametrul acului de printare: 25G Procentul de umplere: 18% Temperatură: 40°C Presiune: 50 kPa Viteza de printare: 6mm/s		<i>În acest caz, presiunea s-a menținut constantă, însă viteza de printare a scăzut, iar suportul obținut prezintă pori aproape dreapți, ușor încărcăți cu 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

Datele experimentale obținute pentru formularea GCK3 (12% gelatină, 2% nanofibre de celuloză, 2% k-carragenan) evidențiază o relație clară între parametrii de printare și calitatea suporturilor imprimate, în concordanță cu comportamentul reologic observat anterior. La o presiune constantă de 80 kPa, creșterea vitezei de printare de la 6 mm/s la 8 mm/s a condus la o fidelitate geometrică mai bună, fără o modificare semnificativă a încărcării porilor cu material. Totuși, la viteza maximă testată de 10 mm/s, suportul a prezentat o formă neregulată și pori dezordonați, iar filamentul a fost discontinuu, ceea ce indică faptul că viteza mare depășește capacitatea de extrudare uniformă a materialului, diminuând astfel calitatea printării.

Reducerea atât a presiunii, cât și a vitezei, la 60 kPa și respectiv 6 mm/s, a generat suporturi cu pori semi-încărcați și de formă ovală, ceea ce sugerează un echilibru precar între debitul de material și viteza de depunere. Creșterea vitezei la 8 și 10 mm/s la aceeași presiune a condus la pori ovali neîncărcați, cu discontinuări ale filamentului în interiorul porilor, ceea ce indică un flux material compromis și o printabilitate redusă. Acest aspect este în acord cu observațiile făcute pentru concentrațiile mai mari de polimeri (GCK1 cu 20% gelatină, 6% nanofibre celuloză și 8% k-carragenan), unde o vâscozitate foarte ridicată a materialului a dus la dificultăți în extrudare la viteze mari.

Reducerea presiunii la 50 kPa cu o viteză de printare de 8 mm/s a permis obținerea unui model cu pori drepecți și o geometrie foarte apropiată de modelul de referință, însă cu discontinuități ale filamentului, reflectând un flux material insuficient de continuu. În schimb, la aceeași presiune, scăderea vitezei la 6 mm/s a dus la formarea unor pori aproape drepecți, ușor încărcați cu material, semnalând o mai bună depunere și stabilitate a filamentului.

Comparativ cu formulările anterioare, în special cele cu concentrații mai ridicate, se poate observa că scăderea concentrației polimerice și implicit a vâscozității facilitează o extrudare mai uniformă la presiuni și viteze moderate, dar limitează printabilitatea la viteze foarte mari din cauza unui flux de material mai puțin coerent. Aceste rezultate subliniază necesitatea unui echilibru fin între concentrație, vâscozitate și parametrii de printare pentru a

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

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

Codul proiectului: 213

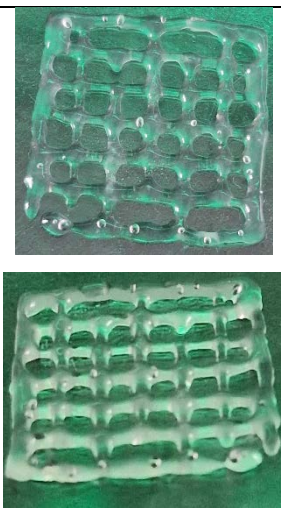
Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

obține structuri cu fidelitate geometrică ridicată și porozitate controlată. Optimizarea concentrațiilor și a parametrilor de printare trebuie să țină cont de aceste aspecte, pentru a asigura o printabilitate optimă și o calitate superioară a suporturilor obținute. Astfel, am continuat cu ajustarea formulării printabile, după cum se poate observa în Tabelul 28, unde au fost adăugate 1.5 g gelatină, 0.2 g nanofibre de celuloză și 0.4 g k-carragenan.

Tabelul 28. Optimizarea parametrilor de printare pentru compoziția GCK4.

GCK4			
Concentrații: 15% Gelatină/2% Nanofibre celuloză/4% K-carragenan			
Nr. Crt	Parametrii de printare	Imagini printare	Observații printare
Set 4			
1	Dimensiunile selectate: 20x20x1 mm Diametrul acului de printare: 22G Procentul de umplere: 22% Temperatură: 40°C Presiune: 15kPa Viteza de printare: 8mm/s		<i>Fidelitatea de printare pentru prima probă a fost scăzută, obținându-se un suport cu pori semi-ovali, uneori conectați, din cauza presiunii scăzute și a vitezei de printare.</i>

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

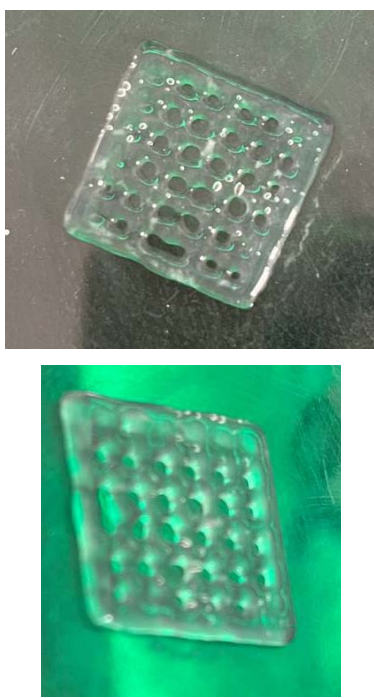
Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

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

2	Dimensiunile selectate: 20x20x1 mm Diametrul acului de printare: 22G Procentul de umplere: 22% Temperatură: 40°C Presiune: 50kPa Viteza de printare: 8mm/s		<i>Creșterea presiunii a condus la formarea unui suport cu pori încărcați de material.</i>
3	Dimensiunile selectate: 20x20x1 mm Diametrul acului de printare: 22G Procentul de umplere: 22% Temperatură: 40°C Presiune: 20kPa Viteza de printare: 8mm/s		<i>Scăderea presiunii a determinat obținerea unui suport cu pori vizibili, dar ovali, indicând o vâscozitate scăzută a materialului de printare.</i>

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

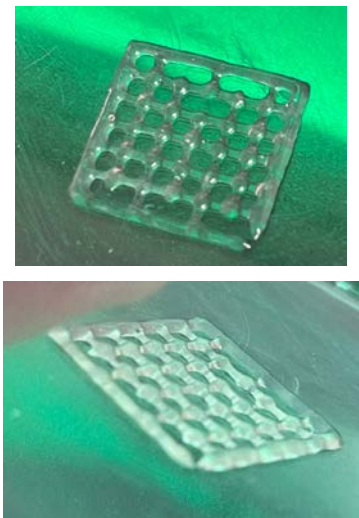
Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

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: 20x20x1 mm Diametrul acului de printare: 22G Procentul de umplere: 22% Temperatură: 40°C Presiune: 20kPa Viteza de printare: 10mm/s		<i>Creșterea vitezei de printare a condus la formarea unui suport cu pori semi-ovali, dar mai puțin încărcăți cu material. Totuși, din cauza vitezei ridicate, aceștia sunt uniți la capete, ceea ce indică o presiune neadecvată pentru această viteză.</i>

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

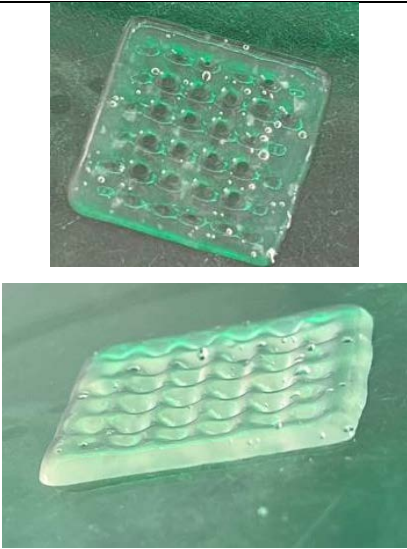
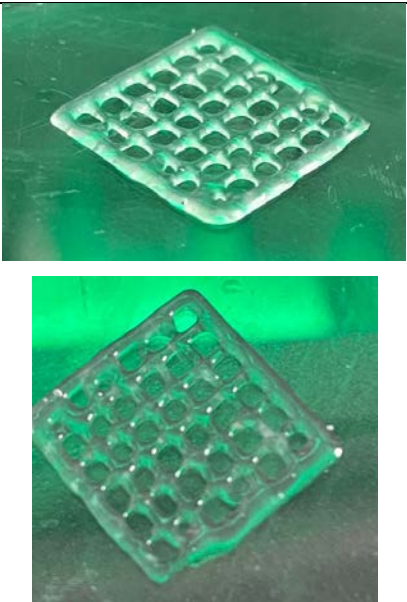
Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

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: 20x20x1 mm Diametrul acului de printare: 22G Procentul de umplere: 22% Temperatură: 40°C Presiune: 30kPa Viteza de printare: 10mm/s		<i>Creșterea presiunii a determinat formarea unui suport cu pori ovali, încărcăți cu material.</i>
6	Dimensiunile selectate: 20x20x1 mm Diametrul acului de printare: 25G Procentul de umplere: 16% Temperatură: 40°C Presiune: 35kPa Viteza de printare: 6mm/s		<i>Schimbarea acului de printare a determinat formarea unui suport mai apropiat de modelul de referință; însă, se poate observa o tendință ușoară de încărcare cu material, cauzată de presiunea ridicată. Totuși, este vizibil că porii suportului tind să devină pătrați atunci când este utilizat acest ac 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

7	Dimensiunile selectate: 20x20x1 mm Diametrul acului de printare: 25G Procentul de umplere: 16% Temperatură: 40°C Presiune: 25kPa Viteza de printare: 6mm/s		<i>Scăderea presiunii de printare a condus la formarea unui suport cu pori interconectați, indicând că presiunea nu a fost adecvată pentru viteza utilizată. Totuși, după cum se poate observa, porii interiori sunt pătrați, iar suportul creat este foarte apropiat de modelul de referință.</i>
8	Dimensiunile selectate: 20x20x1 mm Diametrul acului de printare: 25G Procentul de umplere: 16% Temperatură: 40°C Presiune: 40kPa Viteza de printare: 10mm/s		<i>Creșterea vitezei de printare și a presiunii a condus la formarea unui suport identic cu modelul de referință, observându-se pori pătrați care nu sunt încărcați cu material. Acest rezultat indică o optimizare eficientă a parametrilor de proces, asigurând o distribuție uniformă a materialului și o fidelitate</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>geometrică ridicată față de modelul dorit.</i>
--	--	--	---

Setul 4, utilizând o concentrație crescută de gelatină (15%), un conținut moderat de nanofibre de celuloză (2%) și o proporție ridicată de k-carragenan (4%), a demonstrat un comportament distinct față de seturile anterioare cu concentrații mai scăzute ale acestor componente. Comparativ, concentrațiile anterioare (ex: 10-12% gelatină, 1% NFC, 2% k-carragenan) au generat structuri mai fragile, cu o fidelitate scăzută la variații de presiune și viteză de printare. În cazul Setului 4, creșterea conținutului de gelatină și k-carragenan a contribuit la o vâscozitate mai mare și o stabilitate crescută a gelului, ceea ce a permis o mai bună menținere a formei printate, în special în condiții optimizate de proces. La presiuni scăzute (15-20 kPa) și viteze de 8-10 mm/s, probele au prezentat pori semio-ovalii sau conectați, indicând o extrudare incompletă și o distribuție inegală a materialului, similar cu tendințele observate în formulările anterioare. Totuși, spre deosebire de acele formulări, suportul nu s-a deformat complet, sugerând un efect pozitiv al compoziției mai concentrate. Odată cu creșterea presiunii la 30-50 kPa, suporturile au prezentat pori mai ovali, bine conturați și încărcăți uniform, ceea ce confirmă că formularea din Setul 4 răspunde favorabil la o presiune mai mare, necesară pentru extrudarea unui material mai vâscos. În schimb, în seturile anterioare, presiunile mari duceau adesea la deformări sau colaps structural. Un alt aspect semnificativ în Setul 4 a fost testarea unor ace de diametru mai mic (25G și 35G). Acestea au condus la o fidelitate geometrică ridicată, evidențiindu-se pori pătrați bine definiți, mai ales la presiuni intermediare (25-40 kPa) și viteze moderate (6-10 mm/s). Acest comportament nu a fost

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

observat în seturile anterioare, unde acele subțiri nu reușeau să imprime suficient material, probabil din cauza unei vâscozități insuficiente.

În final, cea mai bună fidelitate de printare în Setul 4 a fost obținută în condițiile: presiune 40 kPa, viteză 10 mm/s, ac 25G, rezultând un suport identic cu modelul de referință – cu pori pătrați, bine conturați și fără exces de material. Acest rezultat demonstrează o optimizare eficientă a procesului, dificil de obținut cu formulările mai diluate testate anterior. Comparativ cu concentrațiile anterioare, compoziția 15% gelatină / 2% NFC / 4% k-carragenan a oferit o fereastră de printare mai largă și o stabilitate crescută, permițând reglaje mai fine ale presiunii, vitezei și diametrului acului. Prin urmare, această formulare se dovedește mai robustă și mai adaptabilă, recomandată pentru obținerea structurilor precise în aplicații biotehnologice sau de inginerie tisulară.

III.1.1.4. Concluzii

Activitățile de cercetare desfășurate în cadrul proiectului „Advanced & Personalized Solutions for Bone Regeneration” au vizat optimizarea formulărilor bioactive și a parametrilor de printare 3D pentru obținerea unor structuri poroase personalizate, compatibile biologic și adecvate substituției osoase. S-au testat patru formulări principale, codificate GCK-GCK4, cu variații semnificative în concentrația de gelatină, nanofibre de celuloză și κ-carragenan:

- GCK1 (martor): 20% gelatină / 6% NFC / 8% k-carragenan
- GCK2: 8% gelatină / 1.5% NFC / 1.5% k-carragenan
- GCK3: 12% gelatină / 2% NFC / 2% k-carragenan
- GCK4: 15% gelatină / 2% NFC / 4% k-carragenan

Formularea GCK1, cu vâscozitate ridicată, a necesitat presiuni de extrudare mari (până la 260 kPa), dar a generat suporturi încărcate, fără porozitate vizibilă. Deși s-a redus presiunea treptat, doar la 220-230 kPa s-a obținut o geometrie acceptabilă, însă cu tendință de colaps la

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

presiuni mai mici. Această formulare s-a dovedit prea rigidă și greu de controlat în procesul de extrudare.

GCK2, cu concentrații semnificativ reduse, a permis testarea la presiuni joase (10-60 kPa), dar a prezentat dificultăți de extrudare constantă și fidelitate scăzută. La presiuni sub 30 kPa, fluxul a devenit instabil, iar structura s-a deformat sau nu s-a format deloc, ceea ce a limitat aplicabilitatea acestei formulări în obținerea scaffoldurilor structurale coerente.

GCK3 a oferit un echilibru intermediar, permițând obținerea unor structuri cu porozitate controlabilă la presiuni de 50-80 kPa. Totuși, vitezele mari de printare (>8 mm/s) au condus la discontinuități ale filamentului, iar fidelitatea geometrică a fost afectată de forma neregulată a porilor.

GCK4, cu 15% gelatină / 2% NFC / 4% k-carragenan, a fost cea mai performantă dintre formulările testate. Aceasta a permis printarea la presiuni moderate (25-40 kPa) și viteze între 6-10 mm/s, fără blocaje sau colaps structural. În special la 40 kPa și 10 mm/s, utilizând un ac de 25G și umplere de 16%, s-a obținut un suport cu pori pătrați, uniformi, fără acumulări de material, fidel modelului de referință. În plus, s-a demonstrat că acul mai subțire (25G vs. 22G) a oferit o precizie geometrică superioară.

În concluzie, formularea GCK4 reprezintă o variantă optimă, cu echilibru bun între vâscozitate, stabilitate structurală și flexibilitate în parametrii de proces. Aceasta este recomandată pentru aplicații biomedicale de înaltă precizie, permițând un control eficient al porozității și formei scaffoldului, esențiale în regenerarea osoasă.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

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. Evaluarea biocompatibilității și a capacității de a promova diferențierea celulară a structurilor din GelMA, gellan metacrilat și diferite concentrații de oxid de grafenă

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

Subactivitatea 1.8. Controlul funcțional și de calitate al componentelor Activității 1. cernelurilor dezvoltate în subactivitățile 1.1 și 1.2.

III.1.2.1. Introducere

Interacțiunea prelungită dintre țesuturile gazdă și structurile implantate impune aplicarea unui protocol riguros de testare a acestor structuri înainte de efectuarea testelor preclinice și clinice [1]. În ultimii 40 de ani, termenul „biocompatibilitate” a fost utilizat în industria biomaterialelor pentru a caracteriza performanța unui material după implantare și pentru a distinge biomaterialele care pot fi utilizate clinic de celelalte materiale [2].

Alegerea biomaterialului potrivit pentru fabricarea unei structuri care provoacă o reacție imunologică minimă sau inexistentă asupra pacientului este un aspect fundamental în ingineria tisulară. Cu toate acestea, principalul motiv pentru care multe dintre aceste sisteme sunt contestate este lipsa informațiilor suficiente cu privire la toxicitatea și biocompatibilitatea lor [3]. Având în vedere interesul crescând pentru utilizarea materialelor pe bază de grafenă în fabricarea structurilor de regenerare osoasă, problema biocompatibilității a dobândit o atenție tot mai mare. Biocompatibilitatea materialelor pe bază de grafenă depinde în mare măsură de proprietățile fizico-chimice intrinseci ale acestora [4]. Studiile au demonstrat că formulările pe bază de oxid de grafenă (GO) prezintă rezultate diferite în ceea ce privește biocompatibilitatea, în funcție de dimensiune, funcționalizare, concentrația utilizată și de modelul *in vitro* utilizat în testele de biocompatibilitate [5], [6]. Evaluarea citotoxicității GO în celulele mamifere a arătat că GO de dimensiuni micro a dus la o citotoxicitate mai ridicată decât GO de dimensiuni nano, în principal datorită vitezei de sedimentare mai rapide și formării de agregate compacte de GO la suprafața celulelor aderente din godeuri, ceea ce inhibă disponibilitatea nutrienților

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

pentru creșterea celulară. Mai mult, rezultatele au indicat că GO prezintă toxicitate dependentă de doză, iar la concentrații mai mari de 50 $\mu\text{g/mL}$, GO de dimensiuni micro a prezentat toxicitate atât pentru celulele umane sănătoase, cât și pentru celulele tumorale [7].

În acest context, evaluarea detaliată a biocompatibilității devine un demers esențial în stabilirea concentrației optime de GO care poate fi integrată în formulările printabile destinate obținerii de structuri funcționale pentru regenerarea țesutului osos. Prin urmare, s-au realizat două teste cu scopul de a evalua citotoxicitatea formulărilor în funcție de concentrația de GO utilizată. Sinteza formulărilor, printarea 3D și liofilizarea structurilor au fost descrise într-un raport anterior. Toate formulările au avut la bază o matrice polimerică conținând gellan metacrilat și gelatină metacrilată (GelMA). Codificarea probelor s-a realizat în funcție de concentrația de GO utilizată, astfel: 0% GO – GG; 0.125% GO – GG-12GO; 0.25% GO – GG-25GO; 0.50% GO – GG-50GO.

III.1.2.2. Materiale și metode

III.1.2.2.1. 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 $\times$ (Gibco™, Thermo Fisher Scientific). Testul colorimetric cu săruri de tetrazoliu MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid, soluția fosfat salin (PBS), dimetilsulfoxidul (DMSO), testul de colorare cu Alizarin Red S, acidul acetic, amoniacul și Triton™ X-100 au fost toate furnizate de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Kitul comercial CyQUANT™ LDH Cytotoxicity Assay a fost achiziționat de la Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, SUA).

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

III.1.2.2.2. Expunerea culturii celulare la structurile analizate

Liniile celulare osteoblaste MG-63 au fost 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. Celulele au fost însămânțate la o concentrație de 100.000 celule/ 500 μL/ godeu într-o placă cu 24 de godeuri și incubate în condiții standard timp de 24 h pentru a permite aderarea acestora la substrat.

Probele cu diferite concentrații de GO (0%, 0.125%, 0.25% și 0.5%) au fost sterilizate anterior prin expunere la radiații gamma, asigurând astfel eliminarea oricărei contaminări microbiene înainte de utilizare. După procesul de sterilizare, probele au fost plasate în contact direct cu celulele MG-63 și incubate pentru 7, respectiv 14 zile. Pentru a asigura imersarea completă a probelor în mediul de cultură și menținerea condițiilor optime de creștere celulară, s-au adăugat suplimentar 2 mL de mediu în fiecare godeu. Incubarea s-a realizat în condiții standard de temperatură (37°C), cu 5% CO₂ și umiditate ridicată (90%). Ulterior perioadei de incubare, au fost efectuate analize specifice pentru evaluarea viabilității celulare, printr-un test cu săruri de tetrazolium MTT și unul pe baza cuantificării eliberării de lactat dehidrogenazei (LDH). De asemenea, a fost realizat și un test de cuantificare a gradului de mineralizare al culturilor celulare în urma expunerii la probe pentru a măsura diferențierea celulară.

Controlul negativ a fost obținut prin incubarea de celule doar cu mediu de cultură complet, iar controlul pozitiv a fost reprezentat de Triton-X 1% în mediu de cultură complet. Datele au fost exprimate ca ±STDEV (deviația standard), iar evaluarea statistică a acestora s-a realizat cu ajutorul funcției Student t-test, pentru care s-au atribuit *p<0,05, **p<0,01, respectiv ***p<0,001.

III.1.2.2.3. Expunerea culturii celulare la structurile analizate

Evaluarea viabilității celulare a fost realizată prin intermediul testului colorimetric bazat pe săruri de tetrazoliu MTT. După finalizarea perioadei de incubare, mediul de cultură a fost îndepărtat, iar celulele au fost expuse unei soluții de MTT preparate prin diluarea a 10%

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

soluție stoc (5 mg/mL MTT în PBS) în mediu de cultură DMEM complet. Probele au fost incubate timp de 2 ore în condiții standard (37°C, 5% CO₂), pentru a permite metabolizarea MTT de către enzimele mitocondriale active din celulele viabile, proces care conduce la formarea de cristale de formazan insolubile în apă.

După încheierea incubării, soluția de MTT a fost îndepărtată, iar cristalele formate au fost dizolvate prin adăugarea de DMSO, pentru a permite cuantificarea. Concentrația de formazan, direct proporțională cu numărul celulelor viabile, a fost determinată prin măsurarea absorbției la o lungime de undă de 570 nm utilizând un spectrofotometru. Valoarea absorbției obținute pentru fiecare probă a fost raportată la cea a controlului negativ, considerat referință (100%), pentru a calcula procentual viabilitatea celulară relativă.

III.1.2.2.4. Evaluarea nivelului LDH eliberat

În vederea cuantificării LDH eliberate în mediul extracelular ca urmare a interacțiunii celulelor MG-63 cu biomaterialul testat, un volum de 50 μL din supernatantul fiecărui godeu a fost prelevat și transferat într-o placă de 96 de godeuri, după finalizarea perioadei de incubare. LDH este o enzimă intracitoplasmatică implicată în conversia lactatului în piruvat în cadrul metabolismului celular anaerob, iar prezența acesteia în mediul extracelular este asociată cu deteriorarea membranei celulare, fiind un indicator specific al citotoxicității de tip necrotic. Pentru determinarea nivelului de LDH eliberat în urma expunerii osteoblastelor umane la biomaterialele ceramice investigate, s-a utilizat testul CyQUANT™ LDH Cytotoxicity Assay, conform protocolului furnizat de producător. Probele au fost incubate cu reactivii specifici ai kitului, iar absorbția optică a fost ulterior măsurată la o lungime de undă de 490 nm, utilizând un spectrofotometru. Nivelul de citotoxicitate a fost exprimat ca procent al LDH-ului eliberat, calculat prin raportarea valorilor obținute la cele ale controlului negativ, considerat standard de referință.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

III.1.2.2.5. Măsurarea gradului de mineralizare

Procesul de diferențiere osteoblastică a fost evaluat prin determinarea gradului de mineralizare al culturilor celulare, în urma expunerii acestora la probele testate. În acest scop, a fost utilizat testul de colorare cu Alizarin Red S, care evidențiază prezența și distribuția depozitelor de calciu (Ca^{2+}) formate în matricea extracelulară. După perioada de incubare, structurile au fost îndepărtate, iar celulele au fost spălate de două ori cu PBS și ulterior fixate cu o soluție de paraformaldehidă 3,7% în PBS, timp de 12–16 ore, la 4°C. Fixarea a fost urmată de spălări suplimentare cu PBS, iar celulele au fost incubate timp de 45 de minute cu o soluție de Alizarin Red S 40 mM, pentru a marca depozitele de calciu. După această etapă, soluția de colorant a fost eliminată, iar celulele au fost clătite cu apă deionizată, pentru a îndepărta excesul de colorant nereacționat.

Ulterior, probele au fost tratate cu o soluție de acid acetic 10%, timp de 1 oră, sub agitare, pentru solubilizarea complexelor formate între colorant și sărurile de calciu. Supernatantul rezultat a fost colectat în microtuburi Eppendorf, alături de ulei mineral pentru a preveni evaporarea, și incubat timp de 10 minute la 85°C, pentru a facilita extracția completă a colorantului. După răcire, soluțiile au fost transferate în tuburi noi, iar acidul acetic a fost neutralizat cu o soluție de amoniac 10%, conform protocolului. Absorbanța soluțiilor obținute a fost măsurată la o lungime de undă de 405 nm utilizând un spectrofotometru. Nivelul de mineralizare celulară a fost exprimat relativ, prin raportarea valorilor absorbției fiecărei probe la absorbția înregistrată pentru controlul negativ.

III.1.2.3. Rezultate și discuții

III.1.2.3.1. Rezultatele testului MTT

Rezultatele obținute în urma testului MTT au evidențiat activitatea metabolică a celulelor osteoblaste MG-63 după expunerea timp de 7 și 14 zile la structurile poroase funcționalizate cu GO (Figura 11). Astfel, probele GG și GG-12GO au prezentat o viabilitate

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

celulară creescută, situată între 70–75% comparativ cu controlul negativ, la ambele intervale de timp investigate. Aceste valori indică un profil biocompatibil, conform criteriilor specificate în standardul ISO 10993-5 privind evaluarea citotoxicității *in vitro*. S-a observat o ușoară reducere a activității metabolice la 14 zile comparativ cu 7 zile, însă diferențele nu au fost statistic semnificative ($p > 0.05$).

În cazul probei GG-25GO, celulele au prezentat o viabilitate de aproximativ 70% după 7 zile de incubare, indicând un comportament biocompatibil cu celulele osteoblaste. Cu toate acestea, la 14 zile, s-a înregistrat o reducere semnificativă a viabilității ($p < 0.001$), cu o scădere de aproximativ 40% față de control, sugerând un efect citotoxic cumulativ asociat expunerii prelungite la această concentrație de GO. De asemenea, proba GG-50GO a determinat o reducere semnificativă a metabolismului celular încă de la 7 zile post-expunere, cu o scădere de aproximativ 40% a viabilității față de controlul negativ ($p < 0.001$). Acest efect a fost menținut și la 14 zile, fără variații semnificative suplimentare, indicând o citotoxicitate semnificativă la concentrații ridicate de GO.

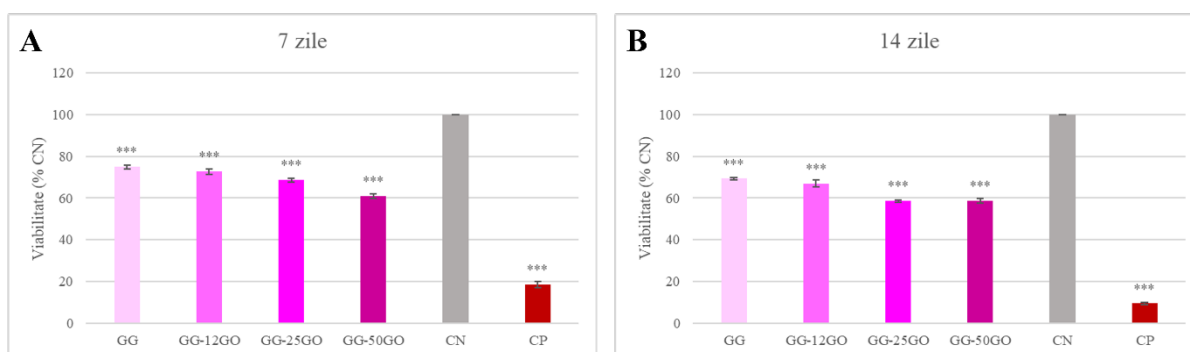


Figura 11. Viabilitatea celulară determinată prin test MTT la 7 zile (A) și 14 zile (B) pentru probele cu 0, 0.125, 0.25 și 0.50% GO.

III.1.2.3.2. Rezultatele cuantificării LDH

Pentru completarea datelor privind biocompatibilitatea materialelor testate și pentru a evidenția potențialele efecte de citotoxicitate de tip necrotic, a fost utilizat testul de eliberare a LDH. Acest test reflectă integritatea membranei celulare, întrucât LDH este o enzimă citosolică

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

eliberată în mediul extracelular exclusiv în urma distrugerii membranei celulare, eveniment asociat morții celulare prin necroză. Precum se poate observa în figura 12, analiza cantității de LDH eliberate în mediul de cultură de către celulele osteoblaste MG-63, după expunerea timp de 7 și 14 zile la structurile cu diferite concentrații de GO a indicat valori comparabile cu cele ale controlului negativ. Aceste rezultate sugerează că toate probele, indiferent de conținutul de GO, nu au indus leziuni semnificative la nivelul membranei celulare, confirmând absența unui efect citotoxic de tip necrotic asupra osteoblastelor.

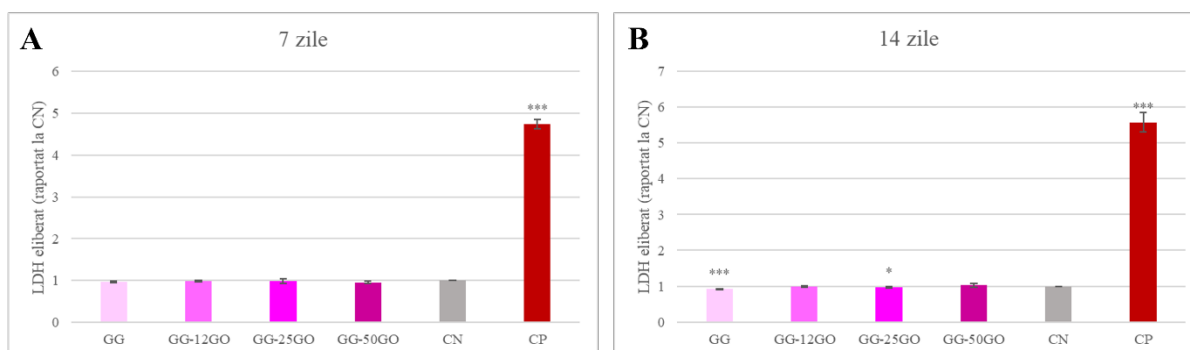


Figura 12. LDH eliberat de celulele osteoblaste după 7 zile (A) și 14 zile (B) de la expunerea la probele cu 0, 0.125, 0.25 și 0.50% GO.

III.1.2.3.3. Rezultatele testului de mineralizare

Pentru a analiza capacitatea de diferențiere a celulelor osteoblaste a materialelor testate, a fost utilizat testul de colorare cu Alizarin Red S, care evidențiază prezența depozitelor de Ca^{2+} formate în matricea extracelulară ca urmare a procesului de mineralizare a celulelor osteoblaste. Gradul de mineralizare este un indicator specific al diferențierii celulare spre fenotipul matur de osteoblast. După 7 zile de expunere la structurile testate (Figura 13), s-a observat o creștere semnificativă a nivelului de mineralizare în culturile celulare tratate cu probele GG, GG-12GO și GG-50GO, comparativ cu controlul negativ ($p < 0,05$), indicând un efect stimulator asupra procesului de diferențiere. În schimb, proba GG-25GO a determinat un răspuns mai scăzut, sugerând o influență redusă asupra acestui proces în etapa incipientă.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

Acest efect a fost corelat pozitiv cu concentrația de GO, indicând o relație doză-răspuns în ceea ce privește stimularea diferențierii osteoblaste.

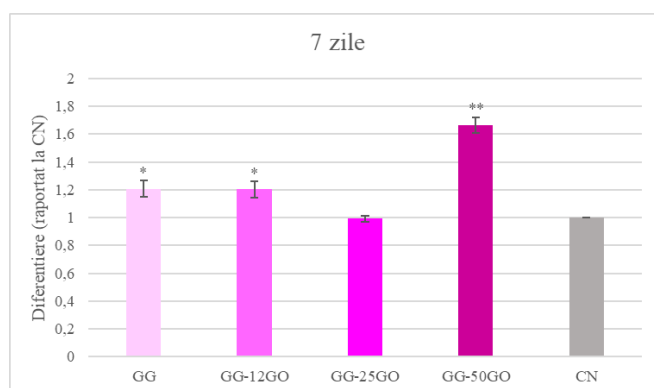


Figura 13. Diferențierea celulelor osteoblaste după 7 zile de la expunerea la probele cu 0, 0.125, 0.25 și 0.50% GO, prin cuantificarea depozitelor de Ca^{2+} formate în matricea extracelulară.

III.1.2.4. Concluzii

Rezultatele obținute în urma testelor de biocompatibilitate *in vitro* au evidențiat un comportament diferit al celulelor osteoblaste MG-63 în funcție de concentrația de GO utilizată pentru ranforsarea structurilor pentru regenerare osoasă. Testul MTT a demonstrat că probele GG și GG-12GO prezintă o viabilitate celulară ridicată (70–75%) și stabilă în timp, în concordanță cu criteriile ISO 10993-5, indicând un profil biocompatibil. Proba GG-25GO a menținut o viabilitate acceptabilă la 7 zile, însă a prezentat o scădere semnificativă la 14 zile, sugerând un posibil efect cumulativ citotoxic la această concentrație. În cazul GG-50GO, s-a observat o citotoxicitate evidentă începând cu ziua 7, efect care s-a menținut și după 14 zile, ceea ce indică citotoxicitate la concentrații crescute de GO. Determinările nivelului de LDH au confirmat absența efectelor citotoxice de tip necrotic pentru toate probele testate, evidențiind integritatea membranei celulare pe întreaga durată a incubării.

În ceea ce privește potențialul de diferențiere celulară, testul de mineralizare cu Alizarin Red S a demonstrat o stimulare semnificativă a diferențierii celulelor osteoblaste pentru probele

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

GG, GG-12GO și GG-50GO, efect corelat cu concentrația de GO. Deși proba GG-25GO a prezentat un răspuns inițial redus, la 14 zile s-a constatat o intensificare a mineralizării. În ansamblu, aceste date sugerează că includerea GO în structurile pentru regenerare osoasă poate modula comportamentul celular într-o manieră dependentă de doză, cu efecte benefice asupra diferențierii la concentrații scăzute și medii, dar cu potențial efect citotoxic la concentrații ridicate.

III.1.2.5. Bibliografie

[1] M. V. Nasonova, T. V. Glushkova, V. V. Borisov, E. A. Velikanova, A. Y. Burago, and Y. A. Kudryavtseva, “Biocompatibility and Structural Features of Biodegradable Polymer Scaffolds,” *Bull Exp Biol Med*, vol. 160, no. 1, pp. 134–140, Nov. 2015, doi: 10.1007/S10517-015-3114-3/METRICS.

[2] K. H. Hussein, K. M. Park, K. S. Kang, and H. M. Woo, “Biocompatibility evaluation of tissue-engineered decellularized scaffolds for biomedical application,” *Materials Science and Engineering: C*, vol. 67, pp. 766–778, Oct. 2016, doi: 10.1016/J.MSEC.2016.05.068.

[3] S. Naahidi et al., “Biocompatibility of hydrogel-based scaffolds for tissue engineering applications,” *Biotechnol Adv*, vol. 35, no. 5, pp. 530–544, Sep. 2017, doi: 10.1016/J.BIOTECHADV.2017.05.006.

[4] A. M. Pinto, I. C. Gonçalves, and F. D. Magalhães, “Graphene-based materials biocompatibility: A review,” *Colloids Surf B Biointerfaces*, vol. 111, pp. 188–202, Nov. 2013, doi: 10.1016/J.COLSURFB.2013.05.022.

[5] C. Martín, K. Kostarelos, M. Prato, and A. Bianco, “Biocompatibility and biodegradability of 2D materials: graphene and beyond,” *Chemical Communications*, vol. 55, no. 39, pp. 5540–5546, May 2019, doi: 10.1039/C9CC01205B.

[6] S. Syama and P. V. Mohanan, “Safety and biocompatibility of graphene: A new generation nanomaterial for biomedical application,” *Int J Biol Macromol*, vol. 86, pp. 546–555, May 2016, doi: 10.1016/J.IJBIOMAC.2016.01.116.

[7] S. F. Kiew, L. V. Kiew, H. B. Lee, T. Imae, and L. Y. Chung, “Assessing biocompatibility of graphene oxide-based nanocarriers: A review,” *Journal of Controlled Release*, vol. 226, pp. 217–228, Mar. 2016, doi: 10.1016/J.JCONREL.2016.02.015.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

III.2. CAPITOL 2

III.2.1. Analiza XPS a nanoplatformelor grafenice funcționalizate

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

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

III.2.1.1. Introducere

Nanomaterialele pe bază de grafenă funcționalizată au atras un interes considerabil în ultimii ani datorită proprietăților lor fizico-chimice deosebite și versatilității funcționale în aplicații biomedicale, inclusiv în livrarea de oligonucleotide și alte biomolecule. Oxidul de grafenă (GO), în special în forma sa carboxilată (GO-COOH), prezintă o suprafață bogată în grupări funcționale care pot fi exploatate pentru ancorarea covalentă a diverselor molecule biologice [1]. Printre strategiile cele mai eficiente de funcționalizare se numără activarea grupărilor carboxil prin intermediul sistemului de cuplare 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimidă (EDC) – N-hidroxisuccinimidă (NHS), ce facilitează legarea amidelor cu aminele primare din structura ADN [2].

Spectroscopia fotoelectronică de raze X (XPS) reprezintă o metodă esențială pentru analiza compoziției chimice de suprafață și identificarea stărilor de oxidare ale elementelor prezente într-un material. Prin evaluarea spectrelor generale (survey) și a spectrelor de înaltă rezoluție (de exemplu, C 1s, O 1s, N 1s), este posibilă confirmarea succesului funcționalizării și caracterizarea detaliată a modificărilor chimice [3]. În acest studiu, analiza XPS a fost utilizată pentru a compara compoziția de suprafață a nanoplatformelor GO-COOH și a celor activate cu EDC-NHS, ulterior funcționalizate cu ADN, evidențiind diferențele semnificative între probe.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

III.2.1.2. Materiale și metode

Analiza XPS a fost realizată cu ajutorul unui spectrometru K-Alpha de la Thermo Scientific (Waltham, MA, SUA), echipat cu o sursă monocromatică Al K α (1486,6 eV), care funcționează în vid la o presiune de bază de 2×10^{-9} mbar. Pentru a compensa efectele de încărcare electrostatică, s-a utilizat un „flood gun”, iar energiile de legătură au fost calibrate prin plasarea vârfului C 1s la 284,8 eV, utilizat ca referință internă.

III.2.1.3. Rezultate și discuții

Analiza XPS a fost utilizată pentru a compara compoziția chimică de suprafață a nanoplatformelor GO-COOH și GO-COOH/EDC-NHS/ADN. Spectrele generale XPS, înregistrate pentru fiecare probă și prezentate în Figura 14 (pentru GO-COOH) și Figura 16 (pentru GO-COOH/EDC-NHS/ADN), au permis determinarea compoziției atomice medii de suprafață (Tabelul 29), în timp ce spectrele de înaltă rezoluție (Figurile 15 și 17) au furnizat informații detaliate despre stările chimice specifice fiecărui element detectat.

Spectrul XPS de ansamblu pentru GO-COOH (Figura 14) prezintă două semnale dominante corespunzătoare carbonului (C 1s) și oxigenului (O 1s), specifice structurii GO. Semnalul C 1s are o pondere de 70,94% (Tabel 29), indicând abundența atomilor de carbon în rețeaua grafenică. Semnalul O 1s, cu un procent de 28,14%, reflectă prezența grupărilor oxigenate precum carboxili, hidroxili și epoxizi, introduse în timpul procesului de oxidare. De asemenea, este detectată o cantitate redusă de sulf (S 2p – 0,92%), care poate proveni din contaminanți reziduali sau din procesul de sinteză. În ansamblu, compoziția chimică este specifică unui material GO funcționalizat cu grupări carboxilice.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

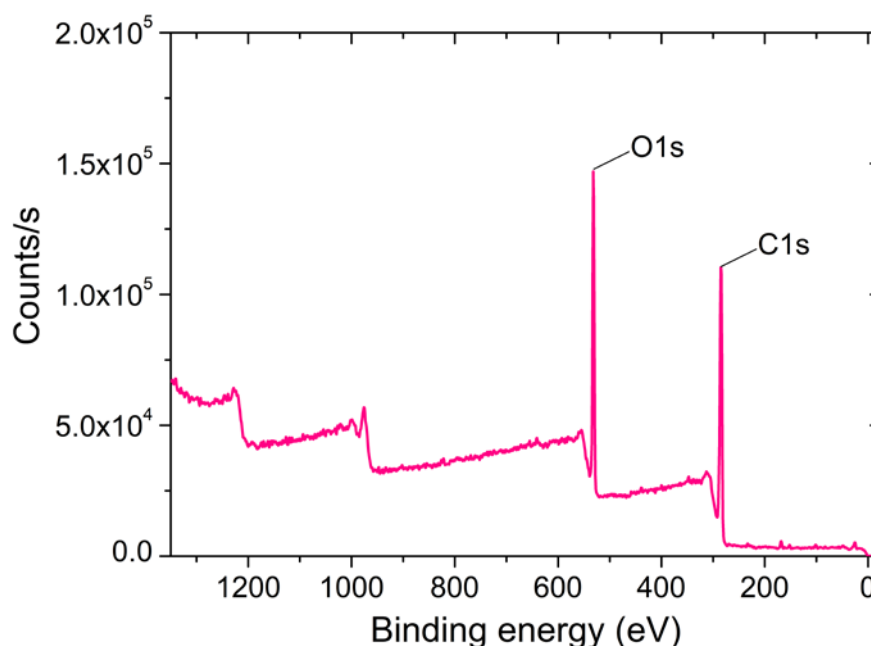


Figura 14. Spectrul general XPS înregistrat pe nanoplatforma GO-COOH.

Figura 15 reprezintă spectrele XPS de înaltă rezoluție ale carbonului (C 1s) și (B) oxigenului (O 1s), înregistrate pe nanoplatforma GO-COOH. Spectrul C 1s (A) evidențiază prezența mai multor legături, precum C–C (284,8 eV), C=C (285,96 eV), C–O (287,35 eV) și O–C=OH (289,15 eV), corespunzătoare grupărilor grafitice, epoxid, carbonil și carboxil. Această distribuție confirmă prezența unei structuri grafenice oxidate cu funcționalități carboxilice, în acord cu literatura de specialitate [1, 2]. Lățimea la jumătate din înălțimea maximă (FWHM) a picurilor (Tabel 1) indică o diversitate chimică ridicată, sugerând o distribuție eterogenă a grupărilor funcționale. În plus, în spectrul O 1s (B) se observă două contribuții majore reprezentate de un semnal amplu în zona 532,9 eV, atribuit legăturilor OH/O=C–OH, și un al doilea vârf în jur de 533,9 eV, caracteristic legăturilor C–O–C (eterice sau epoxidice) [4, 5]. Aceste rezultate sunt în acord cu literatura pentru GO-COOH și susțin prezența grupărilor funcționale necesare reacțiilor ulterioare de activare chimică.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

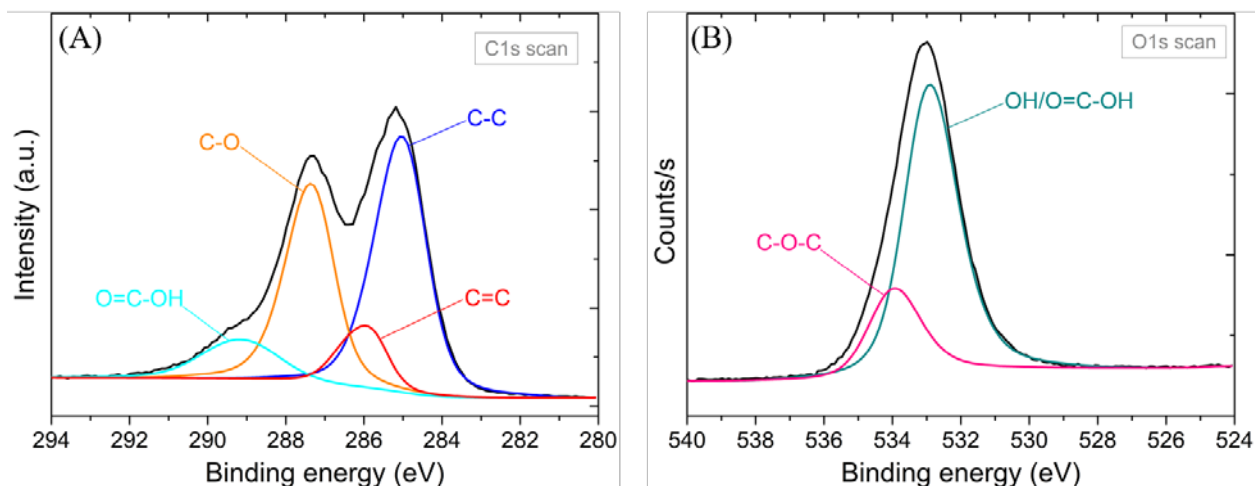


Figura 15. Spectrele XPS de înaltă rezoluție ale (A) carbonului (C 1s) și (B) oxigenului (O 1s), înregistrate pe nanoplatforma GO-COOH.

După activarea cu EDC-NHS și funcționalizarea cu ADN, compoziția chimică de suprafață se modifică semnificativ. Spectrul general XPS (Figura 16) relevă scăderea procentului atomic de carbon (la 60,57%) și oxigen (la 19,06%), însoțite de apariția azotului (2,76%), fosforului (0,08%), magneziului (4,83%), calciului (1,86%), și clorului (7,22%), absente în proba martor (Tabel 29). Aceste variații confirmă ancorarea eficientă a oligonucleotidelor și a reactivilor de activare pe suprafața grafenică.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

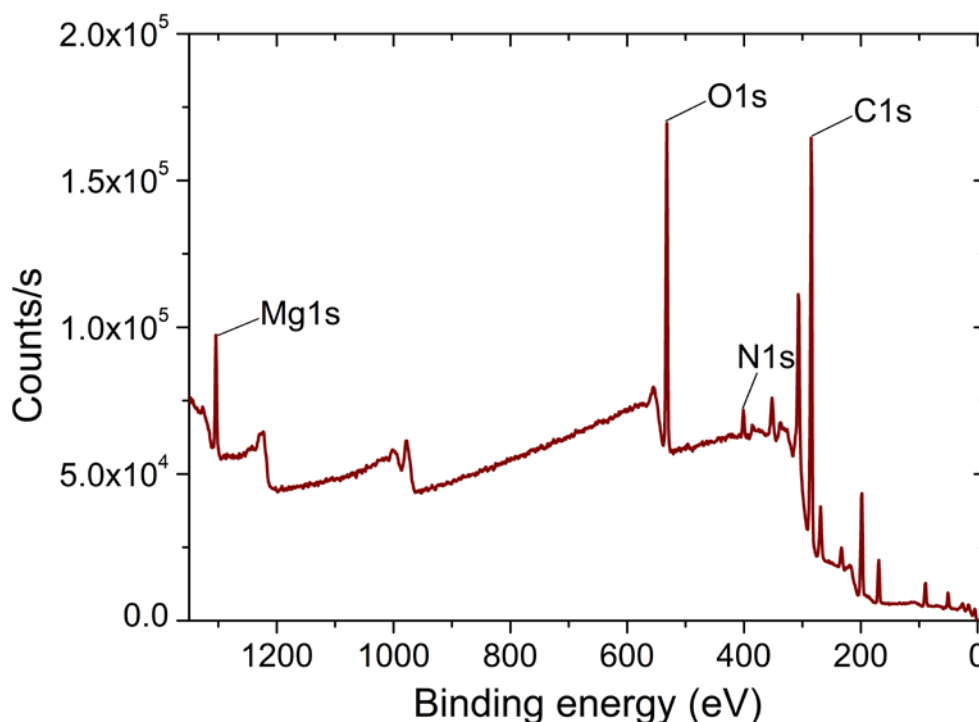


Figura 16. Spectrul general XPS înregistrat pe nanoplatforma GO-COOH/EDC-NHS/ADN.

Figura 17 prezintă spectrele XPS de înaltă rezoluție înregistrate pe nanoplatforma GO-COOH/EDC-NHS/ADN. Spectrul C 1s (Figura 17A) prezintă o structură diferită față de proba GO-COOH. Vârfurile detectate sunt atribuite legăturilor C–C (284,8 eV), C=C/C–N (286,3 eV) și C=O/C–ONO₂ (288,57). Apariția semnalului C–N este un indiciu clar al formării legăturilor amide între grupările carboxilice activate și grupele amino din ADN, în acord cu literatura privind reacțiile de tip EDC/NHS [2]. În plus, componenta nitrat ester (C–ONO₂) este probabil legată de fragmentele din nucleotide sau de impurități reziduale din ADN.

Spectrul O 1s (Figura 17B) păstrează o repartizare similară cu cea observată anterior, cu două vârfuri corespunzătoare OH/O=C–OH (532,6 eV) și C–O–C (533,5 eV), dar cu intensitate relativ mai scăzută, reflectând scăderea grupărilor oxigenate în urma reacțiilor de amidare.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

Spectrul N 1s (Figura 17C) confirmă în mod direct prezența grupărilor azotate. Se evidențiază două componente distincte: una în jur de 400,5 eV, atribuită legăturilor C₂–N–C [3] din bazele nucleotidice (ex: adenină, guanină) și alta în jur de 402,5 eV, atribuită legăturilor N–N sau azotului protonat [6]. Această compoziție azotată este în concordanță cu legarea ADN pe suprafața grafenică.

Spectrul Mg 1s (Figura 17D) prezintă un singur vârf centrat în jurul valorii 1305 eV, specific speciei Mg²⁺. Magneziul provine din clorura de magneziu utilizată pentru legarea ADN de nanoplatforma grafenică. Studiile arată că Mg²⁺ se poate coordona electrostatic cu fosfații din ADN, contribuind la stabilizarea ansamblului [7].

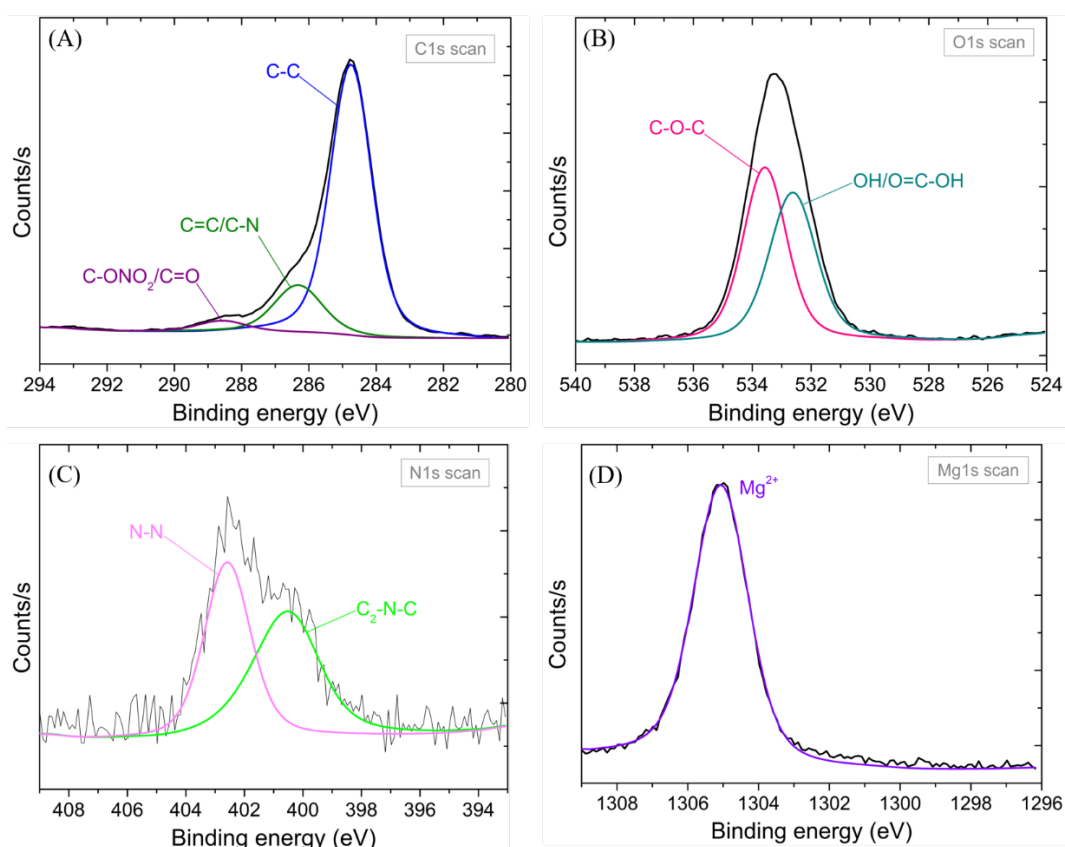


Figura 17. Spectrele XPS de înaltă rezoluție ale (A) carbonului (C 1s), (B) oxigenului (O 1s), (C) azotului (N 1s) și (D) magneziului (Mg 1s), înregistrate pe nanoplatforma GO-COOH/EDC-NHS/ADN.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

Comparând spectrele XPS ale celor două probe, se observă clar succesul funcționalizării chimice. Compoziția chimică a probei GO-COOH este simplă, dominată de carbon și oxigen, cu o structură complexă, dar omogen distribuită. După funcționalizare, proba GO-COOH/EDC-NHS/ADN prezintă o diversitate elementală mai mare, cu apariția azotului și fosforului, markeri direcți ai prezenței ADN, alături de Cl și Mg, ce indică folosirea sării $MgCl_2$ pentru legarea moleculelor ADN de nanoplatformă. În plus, scăderea FWHM în semnalul C 1s sugerează o funcționalizare eficientă, care duce la o rearanjare chimică a suprafeței, cu formarea de structuri mai bine definite. Totodată, prezența unui semnal slab de P 2p la 0,08% susține ipoteza legării de tip covalent a lanțurilor de ADN, dat fiind că atomii de fosfor sunt specifici grupărilor fosfat din structura oligonucleotidelor. De asemenea, semnalul S 2p arată o creștere semnificativă a concentrației de sulf, de la 0,92% în GO-COOH la 3,62% în GO-COOH/EDC-NHS/ADN, ceea ce este în concordanță cu prezența NHS (care conține sulf).

Tabelul 29 prezintă compoziția atomică și valorile FWHM pentru speciile detectate. Comparativ cu proba GO-COOH, se remarcă scăderea conținutului de C și O, însoțită de apariția elementelor N, P și Mg, marcând o tranziție clară de la o suprafață oxidată simplă la una complex funcționalizată. Valoarea FWHM atribuită semnalului C 1s scade de la 4,8 eV la 3,24 eV, sugerând o suprafață mai ordonată chimic, cu mai puține defecte și o distribuție mai clară a stărilor de legătură. În plus, apariția fosforului (P 2p – 0,08%) este un indicator sensibil și specific al ADN-ului, provenind din grupările fosfat ale scheletului zahăr-fosfat.

Tabelul 29. Procentul atomic (%) și lățimea la jumătate din înălțimea maximă (FWHM, eV) înregistrată pentru speciile atomice prezente în nanoplatformele GO-COOH și GO-COOH/EDC-NHS/ADN.

Nume	GO-COOH		GO-COOH/EDC-NHS/ADN	
	Atomic (%)	FWHM (eV)	Atomic (%)	FWHM (eV)
C1s	70.94	4.8	60.57333333	3.24
O1s	28.14333333	3.376666667	19.06333333	3.33
Mg1s	NA	NA	4.83	3.213333333

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

Cl2p	NA	NA	7.223333333	3.7
S2p	0.92	3.466666667	3.62	3.363333333
Ca2p	NA	NA	1.856666667	4.71
N1s	NA	NA	2.76	3.56
P2p	NA	NA	0.076666667	1.063333333

III.2.1.4. Concluzii

Analiza XPS a permis caracterizarea detaliată a nanoplatformelor grafenice înainte și după funcționalizarea chimică cu ADN. Proba GO-COOH a prezentat o compoziție chimică tipică GO, bogată în grupări funcționale reactive. După activarea cu EDC-NHS și legarea ADN, apar semnale suplimentare corespunzătoare elementelor caracteristice acizilor nucleici și a reactivilor utilizați. Reducerea valorii FWHM pentru C 1s, apariția N 1s și P 2p, precum și modificările semnificative în compoziția atomică confirmă modificarea cu succes a suprafeței. Astfel, analiza XPS indică faptul că moleculele ADN au fost ancorate pe nanoplatforme grafenice activate cu EDC-NHS, validând strategia de funcționalizare utilizată în acest studiu.

III.2.1.5. Bibliografie

- [1] S. Yu, J. Liu, W. Zhu, Z.-T. Hu, T.-T. Lim, X. Yan, Facile room-temperature synthesis of carboxylated graphene oxide-copper sulfide nanocomposite with high photodegradation and disinfection activities under solar light irradiation, Scientific Reports 5(1) (2015) 16369. <https://doi.org/10.1038/srep16369>.
- [2] A.I. Pruna, A. Barjola, A.C. Cárcel, B. Alonso, E. Giménez, Effect of Varying Amine Functionalities on CO₂ Capture of Carboxylated Graphene Oxide-Based Cryogels, Nanomaterials 10(8) (2020) 1446.
- [3] M. González-Torres, M.G. Olayo, G.J. Cruz, L.M. Gómez, V. Sánchez-Mendieta, F. González-Salgado, XPS Study of the Chemical Structure of Plasma Biocopolymers of Pyrrole and Ethylene Glycol, Advances in Chemistry 2014(1) (2014) 965920. <https://doi.org/https://doi.org/10.1155/2014/965920>.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

- [4] V. Sridhar, I. Lee, H.-H. Chun, H. Park, Hydroquinone as a single precursor for concurrent reduction and growth of carbon nanotubes on graphene oxide, RSC Advances 5(84) (2015) 68270-68275. <https://doi.org/10.1039/C5RA09871H>.
- [5] A. Stypczyńska, T. Nixon, N. Mason, X-ray radiation of poly-L-arginine hydrochloride and multilayered DNA-coatings, The European Physical Journal D 68(11) (2014) 333. <https://doi.org/10.1140/epjd/e2014-40845-8>.
- [6] M.B. Haider, XPS Depth Profile Analysis of Zn₃N₂ Thin Films Grown at Different N₂/Ar Gas Flow Rates by RF Magnetron Sputtering, Nanoscale Research Letters 12(1) (2017) 5. <https://doi.org/10.1186/s11671-016-1769-y>.
- [7] A. Raza, T. Fiegl, I. Hanif, A. Markström, M. Franke, C. Körner, E. Hryha, Degradation of AlSi10Mg powder during laser based powder bed fusion processing, Materials & Design 198 (2021) 109358. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.matdes.2020.109358>.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

CONCLUZII GENERALE

Activitățile desfășurate în cadrul acestui trimestru au urmărit aprofundarea cunoștințelor privind dezvoltarea, caracterizarea și optimizarea unor sisteme avansate de regenerare osoasă și terapie personalizată, cu accent pe integrarea nanomaterialelor grafenice și a oligonucleotidelor antisens în structuri polimerice bioactive obținute prin printare 3D. Cercetările s-au derulat pe mai multe direcții convergente, printre care dezvoltarea de formulări printabile, funcționalizare chimică a nanoplatformelor grafenice, analiză structurală, evaluări fizico-chimice și teste biologice *in vitro*.

O direcție majoră de cercetare a fost reprezentată de studiul cineticii de gonflare și al stabilității unor scaffolduri obținute din GelMA și gellan metacrilat ranforsate cu GO. Rezultatele au evidențiat o corelație clară între concentrația de GO și comportamentul de gonflare, respectiv degradare în mediu apos, demonstrând că o concentrație moderată (0.125–0.25%) poate conferi o rețea stabilă și reproductibilă, relevantă pentru aplicațiile de susținere tisulară pe termen lung. De asemenea, a fost investigată stabilitatea pe termen lung a scaffoldurilor din gumă gellan și CNFs cu nanofibre electrofilate de CS/PEO. Studiul a demonstrat că o concentrație de 2% CS/PEO conferă cel mai bun raport între stabilitate și degradare controlată pe o durată de 82 de zile, indicând faptul că această formulare este potrivită pentru aplicații ce necesită suport mecanic susținut.

De asemenea, evaluarea biocompatibilității și a potențialului osteoinductiv al structurilor GelMA/gellan/GO a relevat o relație directă între concentrația de GO și comportamentul celular. Concentrațiile scăzute de GO (0.125%) au menținut viabilitatea celulară ridicată și au stimulat mineralizarea, în timp ce concentrații mai mari au indus efecte citotoxice. Aceste date oferă orientări clare pentru optimizarea compoziției în funcție de scopul terapeutic. În plus, analiza structurii semi-cristaline prin analiza XRD a susținut faptul că GO, în concentrații moderate, promovează organizarea ordonată a rețelei polimerice, cu potențial benefic asupra proprietăților mecanice și stabilității în aplicații regenerative.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

O altă direcție strategică a vizat optimizarea formulărilor pe bază de gelatină, CNFs și κ -carragenan pentru tehnologia de printare 3D, fiind selectată varianta GCK4 (15% gelatină / 2% CNF / 4% κ -carragenan) drept formulare ideală, cu echilibru între vâscozitate, stabilitate structurală și control al porozității. Această variantă a demonstrat o fidelitate geometrică superioară, fiind potrivită pentru aplicații biomedicale ce necesită precizie ridicată.

Pe linia dezvoltării de nanoplatforme pentru terapie genică, studiile au abordat funcționalizarea chimică a oxidului de grafenă carboxilat (GO-COOH) cu EDC-NHS, pentru activarea grupărilor funcționale și imobilizarea eficientă a ASO în medii complexe. S-a demonstrat că legarea covalentă asigură o stabilitate superioară față de adsorbția fizică, fiind confirmată prin analize de fluorescență, FTIR, Raman și XPS. Nanoplatformele GO-COOH/EDC-NHS s-au dovedit stabile, reproductibile și eficiente pentru fixarea specifică a materialului genetic, validând potențialul lor în terapii moleculare țintite.

În ansamblu, activitățile desfășurate în acest trimestru au contribuit semnificativ la consolidarea cunoștințelor privind interacțiunea dintre nanomateriale, matrici polimerice și material genetic, în vederea realizării unor soluții personalizate pentru regenerarea osoasă și tratamente moleculare avansate. Direcțiile viitoare vor viza integrarea acestor descoperiri în modele biologice relevante și validarea funcționalității *in vitro* și *in vivo*, cu scopul optimizării caracteristicilor funcționale pentru aplicații tisulare specifice.

Întocmit de membrii echipei de implementare,
Ing. Dobrișan Mihaela Raluca

Avizat de responsabilul de proiect,
Prof. Dr. Ing. Mariana IONIȚĂ

Dr. Ing. Chiticaru Elena Alina

Drd. Ing. Toader Georgian Alin

Data: 30.06.2025

Dr. ing. Cojocaru Elena

Data: 30.06.2025

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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