

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

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 octombrie-decembrie 2025

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

Proiectul REOSTEOMI are ca scop dezvoltarea unor soluții terapeutice de ultimă generație destinate gestionării complicațiilor asociate mielomului multiplu (MM), o afecțiune complexă a măduvei osoase care afectează profund calitatea vieții pacienților. Prin valorificarea progreselor recente în domeniul biomaterialelor și al ingineriei tisulare, proiectul urmărește să creeze platforme funcționale capabile să ofere alternative eficiente și personalizate pentru regenerarea și repararea țesutului osos compromis. Un element central al acestei etape îl constituie dezvoltarea unor suporturi cu arhitectură controlată, optimizate pentru evaluări in vitro și in vivo, capabile să reproducă parametrii morfologici relevanți ai țesutului osos și să asigure un microambient favorabil menținerii viabilității celulare imediat după contact. Aceste structuri sunt concepute pentru a susține atașarea și proliferarea celulară și pentru a facilita difuzia nutrienților și a oxigenului, procese esențiale atât pentru studiile in vitro, cât și pentru integrarea tisulară și răspunsul biologic în modelele in vivo. În acest context, evaluarea corelată a viabilității și comportamentului celular in vitro reprezintă o etapă esențială pentru anticiparea performanței biologice in vivo. Tehnologia de printare tridimensională va fi utilizată ulterior, în mod complementar, pentru fabricarea acestor scaffolduri cu geometrie și porozitate precis controlate.

În cadrul Etapei 10 a proiectului, desfășurată în perioada octombrie-decembrie 2025, eforturile de cercetare s-au orientat asupra sintezei scaffoldurilor pe bază de gelatină, k-caragenan, nanofibre de celuloză (CNFs) și oxid de grafenă carboxilat (COOH-GO) în diferite

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

concentrații, vizând în special investigarea proprietăților *in vitro* și *in vivo*. În paralel, au fost dezvoltate și scaffolduri obținute din gelatină, κ -caragenan, nanofibre de celuloză (CNF) și oxid de grafenă carboxilat (COOH-GO) cât și din alginat, κ -caragenan și spirulină, formulări care au fost ulterior încărcate cu celule osteosarcoma (MG 63), printate și caracterizate din punct de vedere al viabilității celulare prin teste live dead.

Totodată, o componentă complementară a etapei a vizat elaborarea brevetului “Formulare imprimabilă 3D pe bază de k-caragenan, alginat și spirulină pentru suporturi funcționale”. În cadrul acestuia a fost prezentat protocolul pentru realizarea unei formulări imprimabile/ bioimprimabile tridimensionale (3D) pe bază de k-caragenan, alginat și spirulină, și celule în cazul bioimprimării, destinată obținerii de suporturi funcționale imprimate/ bioimprimate 3D, biocompatibile și bioactive, cu potențial efect terapeutic. Aceste rezultate oferă o perspectivă solidă asupra potențialului biomaterialelor nanostructurate în aplicațiile de regenerare osoasă, completând în mod sinergic obiectivele și direcțiile de cercetare ale proiectului REOSTEOMI.

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

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

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

În cadrul acestei subactivități s-a realizat:

-Elaborarea articolului anexat cu titlul „Nanostructural Modulation of GelMA/GellanMA 3D Printed Scaffolds by Graphene Oxide: Implications for Printability and Cellular Response” și înaintarea către publicare la revista “Material Today Nano” cu factor de impact 8.2.

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

În cadrul acestei subactivități s-au realizat:

-Efectuarea de experimente de laborator și implementarea acestora într-o platformă pentru predicția vâscozității, parametrilor de printare și a procentului de printabilitate al diferitelor hidrogeluri polimerice, în vederea elaborării unui brevet.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

- Efectuarea de experimente de dezghețare, menținere și înghețare a liniei celulare osteosarcoma, pentru utilizarea în experimente de viabilitate celulară.

-Efectuarea de experimente de laborator privind sinteza gumei gellan metacrilate

-Efectuarea de experimente de laborator privind sinteza de formulări printabile cu alginat, k-caragenan și spirulină (kA12, kA12/sp-0.5, kA12/sp-1.0 și kA12/sp-5.0) în diverse concentrații pentru elaborarea unui brevet.

Subactivitatea 1.5. Studii preliminare de printare 3D pe 5 axe (penta-axiala)

-Sinteza de formulări printabile din gelatină, κ-caragenan, nanofibre de celuloză (CNF) și COOH-GO pentru bioprintare 3D cu celule.

-Revizuirea și realizarea proof-ului pentru articolului anexat cu titlul “3D Printing of Multicomponent Polymeric Inks Enables Hierarchical Hybrid Architectures for Bone Tissue Regeneration” după acceptarea spre publicare în revista Materials Today Advances (FI 8.0).

-Elaborarea articolului științific anexat de tip review draft cu titlul “Advances in Artificial Intelligence for 3D Printing Tissue Regeneration: A State-of-the-Art Review”

- Efectuarea de experimente de laborator privind dezghețare și realizarea pasajelor celulare pentru celule MG63 pentru experimentele de bioprintare 3D.

Subactivitatea 1.7. Studiul biodisponibilității agenților terapeutici și conservarea caracteristicii 4D a formulărilor printabile.

-Sinteza de formulări printabile din alginat, κ-caragenan și spirulină pentru bioprintare 3D cu celule.

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

În cadrul acestei subactivități s-au analizat:

- Analiza biocompatibilității scaffoldurilor din gelatină, k-caragenan și CNF-uri, grafenă carboxilată și celule osteosarcoma prin teste Live/Dead.

- Analiza biocompatibilității scaffoldurilor din alginat, k-caragenan, spirulină și celule osteosarcoma prin teste Live/Dead.

-Realizarea de analize privind structurile obținute din formulări printabile cu alginat, k-caragenan și spirulină (kA12, kA12/sp-0.5, kA12/sp-1.0 și kA12/sp-5.0) în diverse concentrații pentru elaborarea unui brevet.

- Elaborare brevetului anexat cu titlu „Formulare imprimabilă 3D pe bază de k-caragenan, alginat și spirulină pentru suporturi funcționale” și depunerea cererii de brevet către OSIM înregistrată cu numărul: A/00577

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

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

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

-Realizarea de studii de literatură privind diferitele nanoplatforme și metode optice pe bază de fluorescență utilizate pentru extracția biomoleculilor, în vederea elaborării articolului științific anexat de tip review cu titlul "Recent advances in optical based fluorescence nano/biosensors for ultrasensitive detection.

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

- Realizarea proofului pentru articolul anexat după acceptarea lui cu titlul “Recent Advances in Nanoparticles-Based Systems for the Treatment of Multiple Myeloma” în revista Results in Chemistry cu FI 4.2.

- Elaborarea articolului review anexat, intitulat „Recent advances in optical-based fluorescence nano/biosensors for ultrasensitive detection”.

Activitatea 3. Validarea in vivo a eficienței dispozitivelor REOSTEOMi.

Subactivitatea 3.1. Validarea substituenților osoși în modele de șoarece.

-Efectuarea de experimente de laborator privind sinteza formulărilor pe bază de gelatină, K-caragenan, CNFs și COOH-GO (set III) pentru validarea lor in vivo.

- Realizarea de studii de literatura pentru elaborarea din articolul științific de tip review intitulat „Bridging the Gap in Bone Cancer Research: From Experimental Models to Translational Strategies

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

-Experimente de însămânțare a celulelor MG63, alături de probele conținând gelatină, K-caragenan, CNFs și COOH-GO, în plăci cu godeuri pentru evaluarea biocompatibilității *in vitro*.

- Experimente de implantare a probelor pe bază de gelatină, κ-caragenan, CNFs și COOH-GO, modificate cu EDC/NHS și BMP, la șoareci, în vederea evaluării *in vivo*.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

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. Sinteza formulărilor pe bază de gelatină, K-caragenan, CNFs și COOH-GO pentru validare in vivo

Activitatea 3. Validarea in vivo a eficienței dispozitivelor REOSTEOMi

Subactivitatea 3.1. Validarea substituenților osoși în modele de șoarece.

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

I.1.1.1. Introducere

În medicina regenerativă și ingineria tisulară, dezvoltarea unor soluții biomateriale avansate reprezintă o direcție prioritară pentru regenerarea țesutului osos compromis de patologii severe, precum mielomul multiplu. Leziunile osoase asociate acestor afecțiuni sunt caracterizate prin pierderea arhitecturii structurale, alterarea microambientului celular și capacitate redusă de vindecare spontană, ceea ce limitează eficiența intervențiilor terapeutice convenționale. În acest context, strategiile moderne se concentrează pe dezvoltarea unor substituenți osoși care să ofere simultan suport mecanic, stabilitate în mediul biologic și un microambient favorabil regenerării tisulare și integrării cu țesutul gazdă.

În cadrul proiectului REOSTEOMi Advanced & Personalized Solutions for Bone Regeneration and Complications Associated with Multiple Myeloma, aceste cerințe sunt abordate prin proiectarea și obținerea de formulări polimerice naturale, optimizate pentru aplicații biomedicale și destinate evaluării in vivo. Etapa prezentă urmărește sinteza mai multor seturi de formulări pe bază de gelatină, κ-caragenan, nanofibre de celuloză (CNFs) și oxid de grafenă funcționalizat cu grupări carboxil (COOH-GO), având ca scop obținerea unor materiale cu proprietăți fizico-chimice și biologice controlate, adecvate utilizării ca scaffolduri pentru regenerarea osoasă.

Alegerea acestor componente s-a bazat pe complementaritatea funcțională a acestora în cadrul sistemului compozit. Gelatina oferă o matrice biocompatibilă, cu afinitate celulară 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

capacitate de susținere a adeziunii și proliferării celulare. κ-caragenanul contribuie la reglarea comportamentului reologic și la stabilitatea structurală prin mecanisme de gelificare ionotropă, în timp ce nanofibrele de celuloză asigură consolidarea mecanică și controlul organizării microstructurale. Integrarea COOH-GO în formulare urmărește îmbunătățirea interacțiunilor interfaciale în matricea polimerică și potențialul de modulare a proprietăților mecanice și biologice ale scaffoldurilor.

Astfel, în această etapă a fost elaborat protocolul de lucru și au fost sintetizate formulări stabile și reproductibile, care au fost ulterior turnate în plăci cu godeuri pentru obținerea de scaffolduri cu compoziție controlată, destinate implantării și evaluării comportamentului in vivo din punct de vedere structural și biologic.

I.1.1.2. Materiale și sinteză

Activitatea 3. Validarea in vivo a eficienței dispozitivelor REOSTEOMi

Subactivitatea 3.1. Validarea substituenților osoși în modele de șoarece.

I.1.1.2.1. Materiale utilizate

Gelatină obținută din piele de pește, k-caragenan, COOH-GO, clorura de calciu și genipin au fost achiziționate de la Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, SUA). Nanofibrele de celuloză au fost achiziționate de la Novarials (USA).

I.1.1.2.2. Sinteza formulărilor printabile

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

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

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 – Primele concentrațiile utilizate în realizarea formulărilor printabile.

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

Au fost realizate mai multe seturi de probe, cu variații atât ale concentrațiilor polimerilor, cât și ale agentului de reticulare (genipin). Dintre acestea, setul 5 (Tabelul 1), formulat cu 7 mL fază lichidă de CNF-uri 1%, 2 g gelatină, 0,4 g κ -carragenan, genipin 0,5% și concentrații variabile de COOH-GO, a prezentat cele mai bune rezultate. Componentele au fost adăugate treptat în apă, în ordinea menționată, cu menținerea temperaturii la 40 °C, pentru a facilita solubilizarea gelatinei în mediul ce conținea nanofibrele de celuloză și pentru a preveni denaturarea matricei polimerice, menținând în același timp agitare continuă. După dizolvarea completă a gelatinei, κ -carragenanul a fost adăugat la 50 °C, iar soluția a fost menținută sub agitare intensă timp de 2 ore. Ulterior, soluțiile au fost lăsate la omogenizare peste noapte, sub agitare minimă, pentru eliminarea bulelor de aer.

În ziua următoare, în fiecare formulare au fost adăugați treptat câte 3 mL de soluție de genipin, sub agitare controlată, pentru a asigura o distribuție uniformă a agentului de reticulare

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

în întreaga masă a materialului. Amestecarea a fost continuată timp de 10 minute, interval considerat suficient pentru inițierea reacțiilor de reticulare chimică între grupările funcționale ale genipinului și lanțurile polimerice ale gelatinei, fără a induce gelificarea prematură.

Formulările astfel obținute au fost apoi turnate în plăci cu 96 de godeuri, permițând obținerea unor probe cu volum și geometrie reproductibile, adecvate etapelor ulterioare de implantare și evaluare in vivo. Reticularea ionică a fost realizată prin imersia probelor într-o soluție de clorură de calciu 2% timp de o oră, cu scopul consolidării suplimentare a rețelei polimerice și creșterii stabilității structurale în medii apoase. După finalizarea procesului de reticulare, probele au fost spălate de trei ori cu apă distilată pentru îndepărtarea reziduurilor nelegate și a excesului de săruri, reducând astfel riscul unor efecte citotoxice. În partea finală, scaffoldurile au fost înghețate și liofilizate, obținându-se structuri poroase stabile, adecvate manipulării, sterilizării și evaluării ulterioare în condiții in vivo.

I.1.1.3. Rezultate și discuții

Activitatea 3. Validarea in vivo a eficienței dispozitivelor REOSTEOMi

Subactivitatea 3.1. Validarea substituenților osoși în modele de șoarece.

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

Strategia de sinteză a fost orientată prioritar către obținerea unor formulări compatibile cu aplicațiile in vivo pentru regenerare osoasă, având ca obiectiv principal asigurarea biocompatibilității, stabilității structurale și menținerii integrității scaffoldurilor după implantare. În acest sens, au fost dezvoltate aceste formulări prin ajustarea controlată a concentrațiilor de gelatină, κ -carragenan și CNF, cu scopul de a identifica compoziții care să susțină un microambient favorabil interacțiunii celulare și proceselor de regenerare osoasă, fără a compromite stabilitatea în medii biologice apoase.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

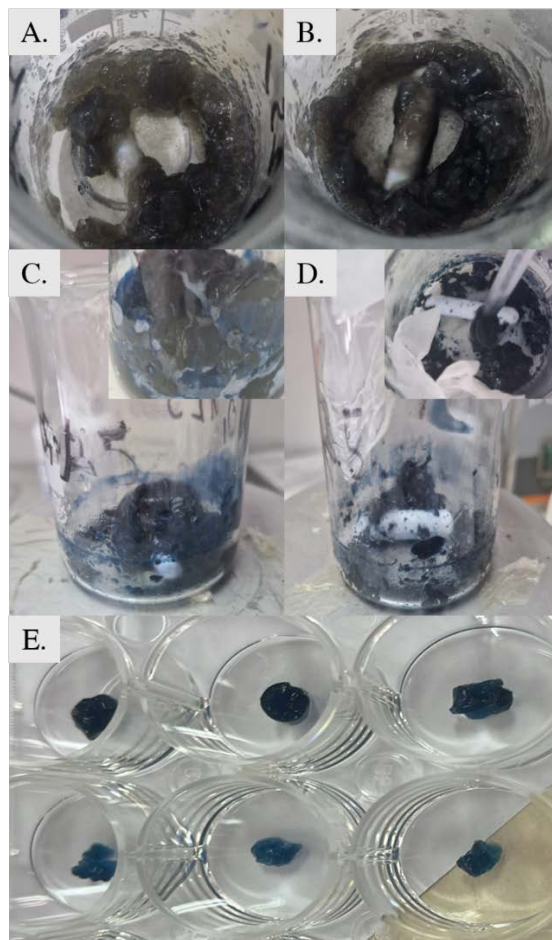


Figura 1. Limitări de procesare și fenomene de gelifiere observate la primele seturi de formulări polimerice în timpul omogenizării și turnării în godeuri.

Această ajustare controlată a protocolului de sinteză a condus la obținerea a cinci seturi distincte de probe. În primele patru seturi au fost întâmpinate limitări tehnologice, care au produs gelificarea inițială soluțiilor în timpul omogenizării.

Aceste efecte pot fi explicate prin mecanisme chimice și fizico-chimice distincte, corelate direct cu observațiile din Figura 1. Astfel, în condiții de temperatură insuficient controlată, κ -carragenanul, un polizaharid sulfatat cu tranziție sol-gel termoreversibilă, începe să formeze structuri helicoidale duble stabilizate prin legături de hidrogen și interacții

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

electrostatice, ceea ce conduce la o creștere prematură a vâscozității și la gelificare parțială în timpul procesării. Acest comportament este evidențiat în Figura 1A și B, unde se observă apariția unei consistențe neomogene și pierderea caracterului fluid al formulărilor. În cazul utilizării unor concentrații ridicate de genipin (1% și 2%), reacțiile de reticulare chimică cu grupările amino libere ale gelatinei sunt accelerate, conducând la formarea rapidă a unei rețele covalente dense. Această reticulare timpurie, ilustrată în Figura 1C și D, determină rigidizarea sistemului încă din etapa de preparare, cu creșterea componentei elastice și limitarea mobilității lanțurilor polimerice. Aceasta consecință a gelificării fizice a κ -carragenanului și a reticulării chimice induse de genipin se poate vedea în Figura 1E, unde formulările prezintă o fluiditate redusă și un comportament reologic solid-like, ceea ce a îngreunat transferul și turnarea uniformă în plăcile cu godeuri.

În urma optimizării succesive a protocoalelor de lucru, prin ajustarea temperaturii de procesare și reducerea concentrației agentului de reticulare, setul 5 a permis obținerea unor formulări stabile și omogene, care au putut fi turnate reproducibil în godeuri și au condus la formarea unor structuri bine definite și uniforme, considerate adecvate pentru aplicațiile in vivo (Figura 2). Aceste rezultate au reflectat selecția și combinarea rațională a componentelor constitutive, fiecare având un rol bine definit în obținerea unui scaffold cu proprietăți structurale și biologice adecvate.

Astfel, gelatina a fost utilizată ca matrice principală datorită biocompatibilității sale ridicate și a capacității de a susține adeziunea și viabilitatea celulară în condiții in vivo. κ -Carragenanul a fost integrat pentru a conferi stabilitate structurală suplimentară scaffoldurilor după hidratare și implantare, contribuind la menținerea formei și coeziunii rețelei polimerice. Nanofibrele de celuloză au fost introduse în concentrații reduse, dar atent controlate, pentru a consolida structura materialului și a limita degradarea prematură, fără a afecta negativ răspunsul biologic. La nivel funcțional, genipinul a fost utilizat ca agent de reticulare chimică pentru a crește stabilitatea rețelei pe termen lung și a reduce citotoxicitatea asociată agenților

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

convenționali, în timp ce reticularea ionică cu CaCl_2 a permis consolidarea suplimentară a structurii și controlul comportamentului în medii fiziologice. COOH-GO a fost introdus atât pentru creșterea rezistenței mecanice a matricei polimerice, cât și ca platformă reactivă pentru modificări ulterioare, grupările carboxil permițând activarea prin sistemul EDC-NHS în vederea formării de legături covalente cu molecule bioactive, precum proteina BMP-2, pentru evaluarea viitoare a răspunsului in vivo în ceea ce privește integrarea tisulară, osteoinductivitatea și dinamica proceselor de regenerare osoasă.

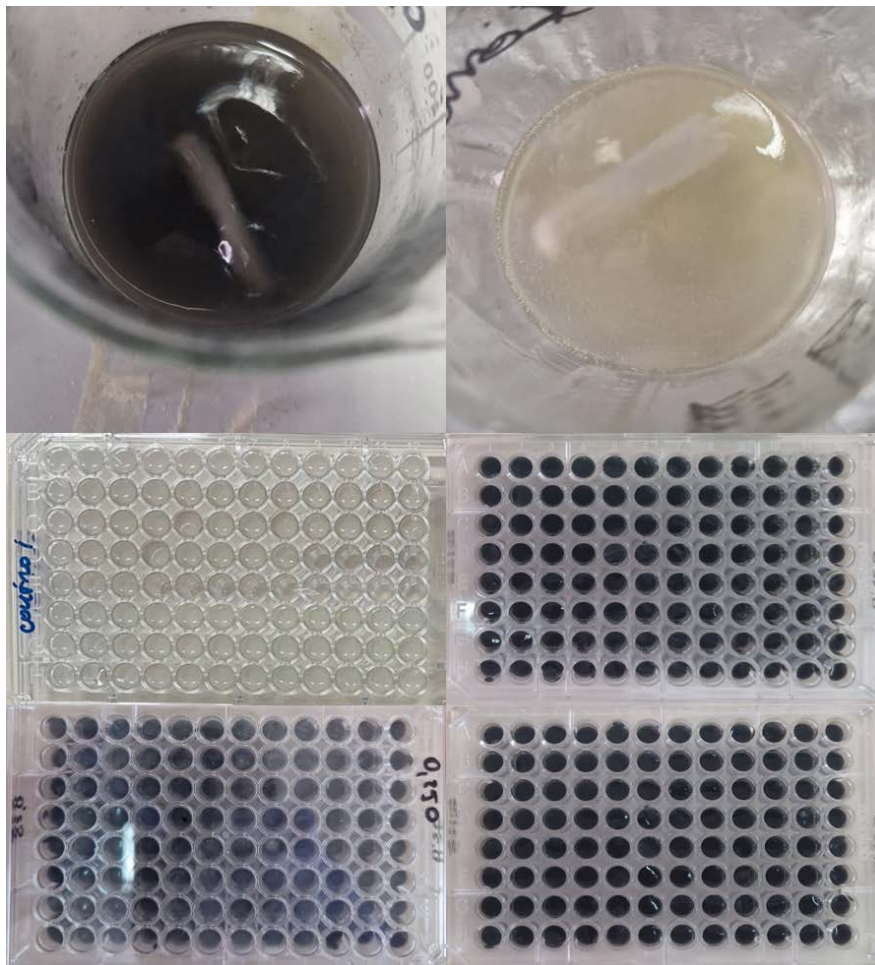


Figura 2. Sinteza setului 5 și probele turnate în godeuri, după optimizarea protocolului de lucru.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

De asemenea, au fost investigate tentativele de reticulare a matricei polimerice direct în godeuri utilizând tripolifosfat de sodiu (TPP) (Figura 3). Din punct de vedere chimic, TPP acționează preponderent ca agent de reticulare ionic prin interacții electrostatice cu grupările încărcate pozitiv ale lanțurilor polimerice. În cazul sistemului analizat, aceste interacții s-au dovedit insuficient de eficiente pentru a genera o rețea tridimensională stabilă, comparabilă cu cea obținută prin reticulare cu ioni Ca^{2+} . Spre deosebire de TPP, ionii divalenți de calciu pot coordona simultan mai multe grupări anionice, favorizând formarea unor punți ionice mai puternice și mai bine organizate între lanțurile polimerice, ceea ce conduce la consolidarea structurală a rețelei. Ca urmare, reticularea cu TPP nu a asigurat rigiditatea și stabilitatea necesare matricei, motiv pentru care protocolul experimental a fost continuat prin utilizarea clorurii de calciu ca agent principal de reticulare.

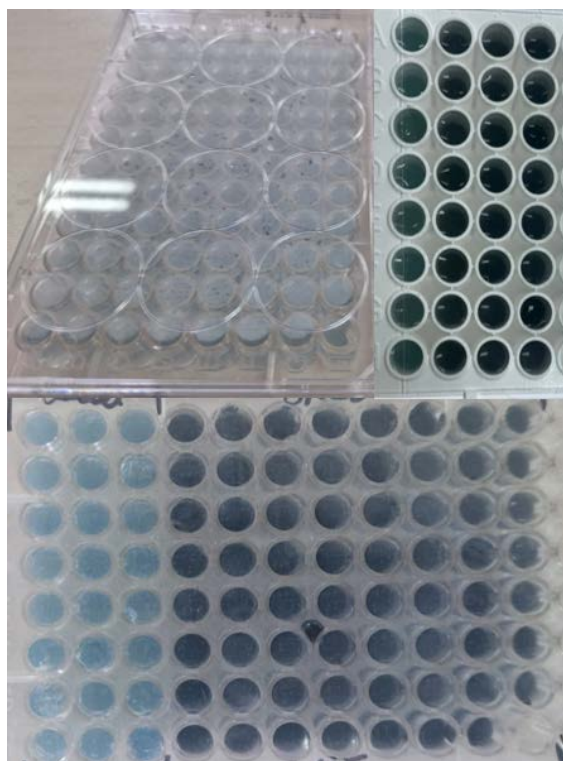


Figura 3. Reticularea probelor cu TPP.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

După reticularea cu clorură de calciu și etapele succesive de spălare, probele turnate în godeuri-uri au fost supuse procesului de înghețare (Figura 4A), urmat de experimentele de liofilizare. Liofilizarea s-a desfășurat pe o durată de 48 de ore, la o presiune de 0,28 bari, după care probele au fost depozitate la temperatura camerei. Caracteristicile structurale ale materialelor obținute după liofilizare sunt dependente de compoziția inițială a formulărilor și de parametrii specifici ai procesului. În mod general, probele prezintă o morfologie poroasă bine definită, evidențiată în Figura 4C și D.



Figura 4. Înghețarea probelor și aspectul acestora după procesul de liofilizare.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

În etapa de evaluare preliminară, descrisă în raportul științific, au fost realizate teste in vitro pentru pregătirea culturii celulare și analiza viabilității utilizând linia celulară MG-63, model osteoblastic standard pentru evaluarea biomaterialelor destinate regenerării osoase. Viabilitatea celulară a fost analizată după o zi și după trei zile de incubare în mediu celular, pentru investigarea răspunsului celular timpuriu și a evoluției acestuia în timp.

După 24 de ore, s-a observat o modificare ușoară a mediului de cultură, asociată unei eliberări limitate de genipin rezidual, fără efecte citotoxice, valorile de viabilitate fiind comparabile cu controlul negativ. După trei zile de incubare, probele au evidențiat o creștere a densității celulare, corelată cu activitatea metabolică intensificată, fără eliberare semnificativă de genipin și fără afectarea stabilității chimice a mediului. În ansamblu, aceste rezultate preliminare confirmă biocompatibilitatea materialelor și capacitatea acestora de a susține un microambient favorabil proliferării celulare, justificând continuarea evaluărilor biologice în etapele ulterioare.

Pentru evaluarea in vivo, probele obținute au fost funcționalizate cu proteina morfogenetică osoasă BMP-2 prin legare covalentă, utilizând chimia carbodiimidică EDC/NHS. Au fost incluse următoarele condiții de control: probe fără BMP-2, probe cu BMP-2 adsorbit ne-covalent și probe cu BMP-2 legat covalent.

1. Prepararea soluției EDC/NHS ($V = 25 \text{ mL}$)

a) Prepararea bufferului MES 0,1 M

Buffer-ul MES a fost utilizat ca mediu de activare a grupărilor carboxil, datorită stabilității reacției EDC/NHS în intervalul de pH ușor acid. S-au dizolvat 490 mg MES în 25 mL apă distilată, iar pH-ul soluției a fost ajustat la 6,1, fiind menținut obligatoriu în intervalul 4,5–6,5. Ajustarea pH-ului s-a realizat utilizând soluții diluate de HCl și NaOH, obținute după cum urmează: soluție HCl 6 M (5 mL HCl 12 M, 37%, + 5 mL apă), soluție HCl 1 M (1,66 mL HCl 6 M + 8,34 mL apă) și soluție NaOH 0,1 M (40 mg NaOH dizolvate în 10 mL apă) [1,2].

b) Prepararea soluției EDC/NHS

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

Soluția de activare a fost preparată la concentrații finale de 23 mg/mL EDC (≈ 120 mM) și 5,6 mg/mL NHS ($\approx 48,6$ mM). EDC a fost cântărit și dizolvat în apă rece imediat înainte de utilizare. Ulterior, 575 mg EDC au fost dizolvate în 25 mL tampon MES 0,1 M, sub agitare ușoară, strict până la omogenizare. Peste această soluție s-au adăugat 140 mg NHS, continuând agitarea până la dizolvare completă. Soluția EDC/NHS a fost filtrată steril și utilizată imediat, în decurs de 10–20 minute la temperatura camerei; pentru utilizări întârziate, soluția a fost păstrată la 4 °C pentru intervale scurte [2-4].

2. Activarea grupărilor carboxil ale probelor

Pentru activarea grupărilor carboxil expuse la suprafața probelor, în fiecare godeu au fost adăugați 100 μ L soluție EDC/NHS, asigurându-se contactul complet al reactivilor cu suprafața materialului. În aceste condiții, probele au fost incubate timp de 2 ore la temperatura camerei, pentru a permite activarea eficientă a grupărilor carboxil și formarea intermediarilor activi de tip ester NHS, capabili să reacționeze ulterior cu grupările amino ale biomoleculelor. După finalizarea etapei de activare, probele au fost spălate de 3–4 ori cu apă distilată, în scopul îndepărtării reactivilor neconsumați și a subproduselor de reacție, prevenind astfel reacțiile nespecifice în etapa următoare de funcționalizare.

Imobilizarea covalentă a BMP-2. Proteina BMP-2 a fost preparată sub formă de soluție stoc în tampon MES 50 mM, la o concentrație de 10 μ g/mL, tampon ales pentru compatibilitatea sa cu chimia EDC/NHS și menținerea stabilității proteinei. Tamponul MES 50 mM a fost obținut prin dizolvarea a 253 mg MES în 26 mL apă ultrapură, urmată de omogenizare completă. BMP-2 liofilizată a fost reconstituită prin adăugarea a 1 mL din acest tampon, obținându-se soluția stoc. Din aceasta, soluția de lucru a fost preparată prin diluarea BMP-2 la o concentrație finală de 250 ng/mL, utilizând 650 μ L soluție stoc BMP-2 și 25,35 mL tampon MES 50 mM, conform protocoalelor raportate în literatură [2–5]. Soluția obținută a fost utilizată ulterior pentru imobilizarea covalentă a BMP-2 pe suprafața probelor activate. Pentru legarea covalentă, în fiecare godeu s-au adăugat 100 μ L soluție BMP-2, urmată

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

de incubare timp de 1 oră la temperatura camerei, pentru a permite reacția dintre grupările amino ale proteinei și esterii activați de pe suprafața probelor.

La finalul incubării, probele au fost spălate cu apă distilată pentru îndepărtarea proteinei nelegate, fiind astfel pregătite pentru etapele ulterioare de implantare și evaluare in vivo. O imagine a probelor înainte de implantare este prezentată în Figura 5. Probele au avut un diametru de 0,5 cm în vedere de sus și de 0,5–0,6 cm în vedere laterală. În total au fost implantate 200 de probe, câte două probe per șoarece, corespunzător unui număr de 100 de șoareci împărțiți în 10 loturi. A fost inclus un lot de control, fără EDC și fără BMP, iar celelalte loturi au cuprins, pentru fiecare concentrație de COOH-GO, câte un lot cu BMP, un lot cu EDC/NHS și un lot cu EDC/NHS–BMP.

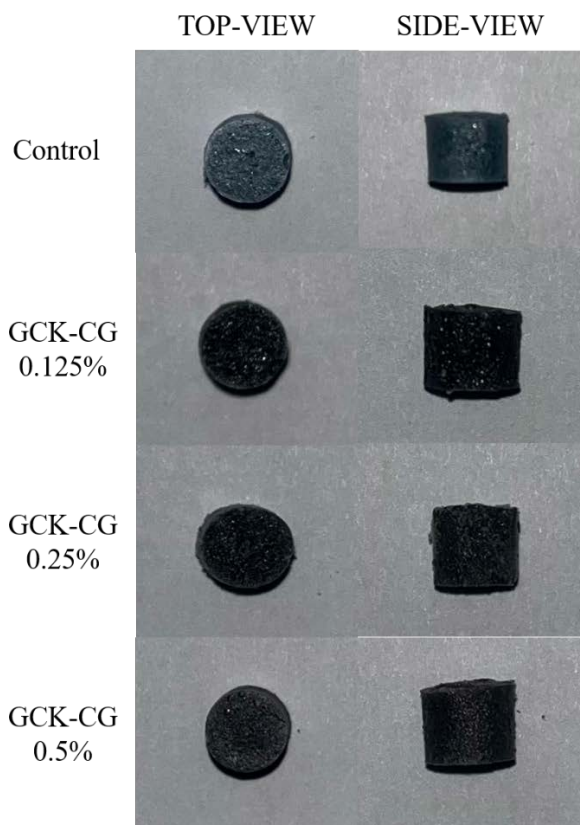


Figura 5. Imagini macroscopice cu probele înainte de implantare.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

Experimentele *in vivo* au fost realizat pe șoareci masculi și femele, cu vârste cuprinse între 6 și 8 săptămâni și greutate de 20-30 g, procedurile de implantare fiind efectuate de colaboratorii de la Universitatea „Vasile Goldiș”. Toate etapele de manipulare și utilizare a animalelor au respectat prevederile Directivei UE 2010/63/UE privind protecția animalelor utilizate în scopuri științifice, fiind aprobate de Comitetul de Etică pentru Cercetare Științifică al Universității (nr. de aprobare 27/31.05.2023) și autorizate de Autoritatea Națională pentru Siguranța Alimentară și Veterinară.

Animalele au fost puse în cuști ventilate individual, cu acces la hrană și apă, menținute în condiții standardizate de mediu, respectiv temperatură de 22 ± 2 °C, umiditate relativă de $50 \pm 5\%$ și ciclul lumină/întuneric de 12 ore. Procedurile chirurgicale au fost realizate în condiții aseptice, șoarecii fiind anesteziați prin administrare de ketamină/xilazină.

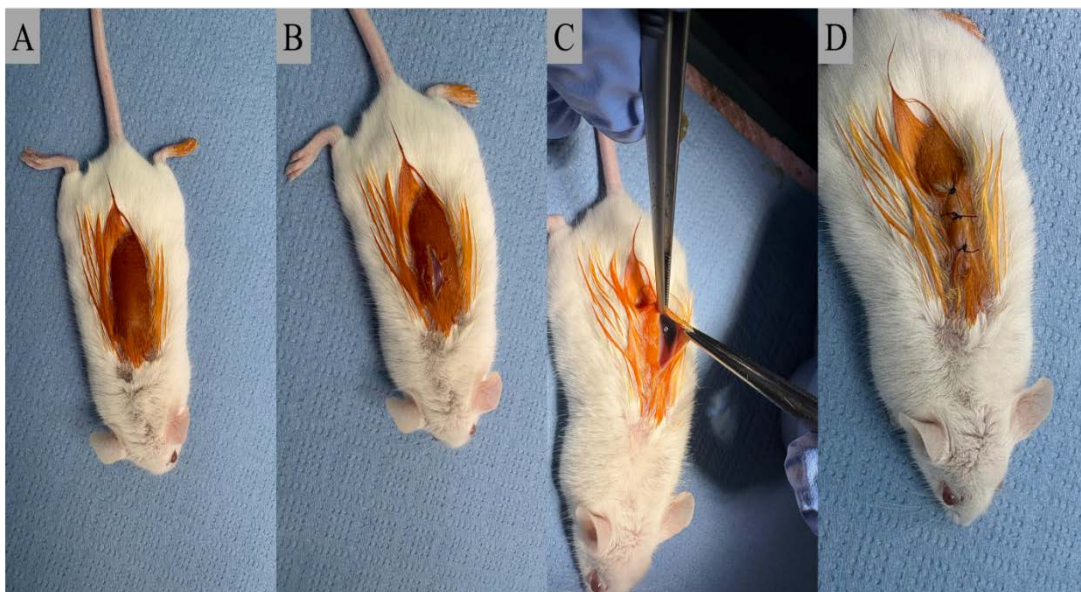


Figura 6. Procesul de implantare al probelor. A. Curățarea locului de implantare cu betadină, B. Realizarea inciziei la nivelul locului de implantare, C. Implantarea probei în zona inciziei și D.

Suturarea locului de implantare.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

Cele patru tipuri de materiale descrise anterior au fost implantate în buzunare subcutanate create la nivelul regiunii dorsale a șoarecilor. Etapele procedurii de implantare sunt ilustrate în figura 6 și au inclus: A. curățarea locului de implantare cu betadină, B. realizarea inciziei la nivelul zonei de implantare, C. introducerea probei în buzunarul subcutanat și D. suturarea locului de implantare.

După intervenția chirurgicală, șoarecii vor fi monitorizați pe o perioadă de câteva luni, în vederea evaluării toleranței locale și sistemice la materialele implantate, precum și a evoluției proceselor biologice asociate. Monitorizarea va include observații periodice privind starea generală a animalelor, comportamentul, greutatea corporală și integritatea plăgii chirurgicale, pentru identificarea timpurie a eventualelor semne de inflamație, infecție sau reacții adverse. La intervale de timp prestabilite, animalele vor fi supuse evaluărilor specifice, iar la finalul perioadei de studiu probele implantate și țesuturile adiacente vor fi recoltate pentru analize histologice și imunohistochimice, în scopul investigării răspunsului tisular, a gradului de integrare a materialelor și a efectelor biologice induse de funcționalizarea acestora.

I.1.1.4. Concluzii

Rezultatele obținute în cadrul acestui raport evidențiază o corelare clară între compoziția formulărilor, parametrii de procesare și comportamentul fizico-chimic și biologic al scaffoldurilor dezvoltate pentru aplicații de regenerare osoasă. Experimentele au arătat că formulările inițiale, în care controlul temperaturii și al concentrației agentului de reticulare nu a fost optim, au condus la fenomene de gelificare prematură și reticulare accelerată, manifestate prin creșterea rapidă a vâscozității și pierderea caracterului fluid al sistemului. Aceste efecte au fost atribuite atât tranziției sol–gel termoreversibile a κ -carragenanului, cât și cineticii rapide a reacțiilor de reticulare chimică ale genipinului la concentrații ridicate, care au limitat procesabilitatea și turnarea uniformă în godeuri

Optimizarea succesivă a protocolului de sinteză a permis identificarea setului 5 ca formulare optimă, caracterizată prin stabilitate reologică, omogenitate și reproductibilitate.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

Ajustarea temperaturii de procesare și reducerea concentrației de genipin au prevenit gelificarea timpurie, permițând obținerea unor probe cu geometrie controlată și integritate structurală adecvată. Această formulare reflectă o combinație rațională a componentelor, în care gelatina asigură biocompatibilitatea și suportul pentru interacțiunile celulare, κ-carragenanul contribuie la stabilitatea structurală prin gelificare ionotropă, iar nanofibrele de celuloză consolidează rețeaua polimerică și limitează degradarea prematură în medii apoase

Studiile comparative de reticulare au demonstrat că tripolifosfatul de sodiu nu generează o rețea tridimensională suficient de stabilă în acest sistem, interacțiunile sale electrostatice fiind mai slabe și mai puțin organizate decât punțile ionice formate de ioni Ca^{2+} . Reticularea cu clorură de calciu a condus la o consolidare superioară a structurii, evidențiind rolul esențial al ionilor divalenți în stabilizarea scaffoldurilor destinate implantării. Etapele ulterioare de înghețare și liofilizare au permis obținerea unor structuri poroase bine definite, morfologia rezultată fiind dependentă de compoziția inițială și de parametrii procesului, dar adecvată pentru aplicații de inginerie tisulară

Evaluările biologice preliminare *in vitro* au confirmat biocompatibilitatea materialelor dezvoltate. Testele de viabilitate celulară realizate pe linia MG-63 au arătat că, după 24 de ore de incubare, probele nu induc efecte citotoxice, valorile fiind comparabile cu controlul negativ, în pofida unei eliberări limitate de genipin rezidual. După trei zile de incubare, s-a observat o creștere a densității celulare, corelată cu activitatea metabolică intensificată, fără indicii de eliberare semnificativă a agentului de reticulare. Aceste rezultate sugerează că scaffoldurile nu doar mențin viabilitatea celulară, ci creează un microambient favorabil proliferării, demonstrând stabilitatea chimică a rețelei și compatibilitatea cu mediul biologic

Experimentele *in vivo* au constatat în implantarea mai multor seturi de materiale în buzunare subcutanate dorsale la șoareci masculi și femele, procedurile fiind realizate de colaboratorii de la Universitatea „Vasile Goldiș”, conform unui protocol chirurgical bine definit. Pentru fiecare grup experimental, probele au fost implantate în condiții aseptice,

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

urmând etape standardizate de pregătire a locului de implantare, realizare a inciziei, introducerea materialului și suturare. Animalele au fost menținute în condiții controlate și supuse unui program de monitorizare pe termen mediu, în vederea evaluării toleranței locale și sistemice, precum și a evoluției post-operatorii. La finalul perioadei de studiu, probele implantate și țesuturile adiacente vor fi recoltate pentru analize histologice și imunohistochimice, aceste etape permițând caracterizarea răspunsului tisular și a gradului de integrare a materialelor dezvoltate.

În ansamblu, datele obținute demonstrează că formulările optimizate din setul 5 îndeplinesc cerințele esențiale pentru substituenți osoși destinați evaluării in vivo, combinând stabilitatea structurală, procesabilitatea și biocompatibilitatea. Integrarea COOH-GO în matricea polimerică oferă o platformă reactivă pentru funcționalizare bioactivă, permițând imobilizarea controlată a proteinelor osteoinductive. Astfel, legarea covalentă a BMP-2 prin activarea grupărilor carboxil cu EDC-NHS reprezintă o etapă cheie pentru creșterea potențialului osteoinductiv al scaffoldurilor, asigurând stabilitatea locală a factorului bioactiv și reducând riscul difuziei necontrolate. Această abordare creează premisele pentru corelarea favorabilă între rezultatele de viabilitate celulară obținute in vitro și performanța biologică a materialelor în evaluările ulterioare in vivo.

Bibliografie:

1. Du, YW., Zhang, LN., Ye, X. *et al.* In vitro and in vivo evaluation of bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) immobilized collagen-coated polyetheretherketone (PEEK). *Front. Mater. Sci.* **9**, 38–50 (2015). <https://doi.org/10.1007/s11706-015-0276-x>
2. Sundermann, J., Zagst, H., Kuntsche, J., Wätzig, H., & Bunjes, H. (2020). Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP-2) Aggregates Can be Solubilized by Albumin—Investigation of BMP-2 Aggregation by Light Scattering and Electrophoresis. *Pharmaceutics*, *12*(12), 1143. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12121143>
3. Poldervaart, Michelle T., Huanan Wang, Johan van der Stok, Harrie Weinans, Sander CG Leeuwenburgh, F. Cumhur Öner, Wouter JA Dhert, and Jacqueline Alblas. "Sustained release of BMP-2 in bioprinted alginate for osteogenicity in mice and rats." *PloS one* *8*, no. 8 (2013): e72610. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072610>

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE
POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

4. Chiticaru, Elena A., Luisa Pilan, and Mariana Ioniță. "Electrochemical detection platform based on RGO functionalized with diazonium salt for DNA hybridization." *Biosensors* 12, no. 1 (2022): 39. <https://doi.org/10.3390/bios12010039>
5. Wang, Lei, Yuanliang Huang, Kefeng Pan, Xinquan Jiang, and Changsheng Liu. "Osteogenic responses to different concentrations/ratios of BMP-2 and bFGF in bone formation." *Annals of biomedical engineering* 38, no. 1 (2010): 77-87. <https://doi.org/10.1007/s10439-009-9841-8>.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

PARTEA a II-a

II.1. CAPITOL 1

II.1.1. Platformă pentru detecția vâscozității, parametrilor de printare și a procentului de printabilitate pentru hidrogeluri

II.1.1.1. Introducere

În cadrul proiectului REOSTEOMi, optimizarea formulărilor polimerice destinate regenerării osoase reprezintă un obiectiv central, având în vedere necesitatea de a dezvolta scaffolduri personalizate, cu proprietăți mecanice, structurale și biologice adecvate defectelor sau complicațiilor asociate mielomului multiplu. În acest context, biofabricarea prin printare 3D oferă un avantaj major, deoarece permite controlul precis al structurii, al porozității și al distribuției materialelor bioactive în cadrul scaffoldului. Totuși, identificarea unei formulări printabile de eficiente care să fie în același timp printabilă, stabilă și compatibilă biologic necesită, în mod tradițional, multiple cicluri experimentale consumatoare de timp și resurse. Din acest motiv, posibilitatea de a anticipa încă din fazele timpurii dacă o concentrație, o temperatură sau o combinație de parametri este adecvată pentru extrudare devine esențială pentru accelerarea procesului de dezvoltare. Predicția preliminară a vâscozității, a presiunii necesare și a stabilității stratului poate elimina formulările necorespunzătoare încă înainte de experimentare, permițând orientarea rapidă către intervalele optime și reducând în mod semnificativ numărul de teste empirice.

În acest sens, dezvoltarea unei platforme digitale capabile să estimeze comportamentul reologic și printabilitatea hidrogelurilor contribuie direct la obiectivele proiectului, facilitând selecția rațională a biopolimerilor și ajustarea fină a proprietăților acestora. Integrarea unor modele predictive în fluxul de biofabricare permite nu doar scurtarea timpului de lucru, ci și o abordare mult mai țintită în identificarea hidrogelului ideal pentru construirea scaffoldurilor funcționale necesare regenerării osoase avansate.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

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. Matertiale și metode

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

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

Platforma este implementată sub forma unei pagini HTML în care utilizatorul introduce valorile necesare calculului: tipul polimerului, masa utilizată în formulă, volumul soluției, dimensiunile duzei și temperatura de lucru. În paralel cu dezvoltarea acestei platforme digitale, au fost desfășurate o serie de experimente de laborator menite să valideze și să calibreze modelul reologic și parametrii de printabilitate integrați în aplicație. În această etapă a fost selectată gelatina ca material de referință, având în vedere biocompatibilitatea ridicată, disponibilitatea, comportamentul termogelifiant bine caracterizat și utilizarea sa largă în biofabricare ca polimer-model pentru optimizarea condițiilor de extrudare.

Astfel, au fost sintetizate soluții de gelatină la concentrațiile de 1%, 3%, 5% și 10%, care au fost testate sistematic pentru determinarea presiunilor necesare extrudării la diferite temperaturi, precum și pentru caracterizarea vâscozității prin analize reologice controlate. Datele experimentale obținute au fost utilizate pentru a stabili relații de dependență între concentrație, temperatură, vâscozitate și presiunea necesară în timpul printării, relații care ulterior au fost introduse, ajustate și validate în cadrul platformei. În acest fel, modelul implementat reproduce cât mai fidel comportamentul observat în laborator și permite extrapolarea parametrilor către alte condiții de lucru.

Interfața platformei este concepută astfel încât valorile introduse să fie preluate de funcțiile JavaScript la apăsarea butonului „Compute & Predict”, moment în care se declanșează întregul flux de calcul. În prima etapă sunt determinate concentrația soluției (% w/v) și molaritatea, folosind relații standard bazate pe raportul masă–volum și masa moleculară a polimerului. Ulterior, vâscozitatea soluției este estimată printr-un model empiric care ia în considerare vâscozitatea apei la temperatura selectată, vâscozitatea de referință a polimerului la 1% și efectele de creștere a vâscozității induse de variația concentrației și de apropierea 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

temperatura de gelificare. Pentru polimerii termogeli, precum gelatina, acest model include o creștere suplimentară a vâscozității sub temperatura critică, reflectând cu acuratețe comportamentul observat în experimentele reologice.

Presiunea recomandată pentru extrudare este calculată printr-o funcție care corelează vâscozitatea estimată cu intervalele tipice de presiune utilizate în bioprintarea hidrogelurilor. Viteza de printare este ajustată în mod corespunzător pentru a asigura un debit stabil și formarea unor linii uniforme. Pentru evaluarea capacității reale de printare, platforma integrează trei indicatori esențiali extrudabilitatea, păstrarea formei stratului (shape retention) și rezoluția calculați prin relații fizico-matematice derivate din principiile fluxului laminar, reologiei newtoniene și geometriei extrudării

Aceste informații sunt combinate într-un scor final, exprimat procentual, care sintetizează calitatea printabilității pentru parametrii selectați. Platforma oferă suplimentar o clasificare calitativă („Excellent”, „Good”, „Borderline”, „Poor”), o predicție asupra calității scaffold-ului obținut, precum și recomandări pentru calibrarea parametrilor de lucru și pentru alegerea duzei adecvate pe baza presiunii, vâscozității și scorului de modelare.

Prin integrarea directă a datelor experimentale generate în laborator, platforma nu numai că reproduce comportamentul real al gelatinei în condiții variate de printare, dar permite și extrapolarea către formulări noi, reducând semnificativ efortul experimental și orientând procesul de biofabricare către intervalele optime de lucru încă din fazele timpurii ale dezvoltării.

II.1.1.3. Rezultate și discuții

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

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

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

Analiza comparativă a tabelelor 1 și 2 evidențiază o relație directă și așteptată între vâscozitatea soluțiilor de gelatină și presiunea necesară pentru extrudare în funcție de concentrație și temperatură. În toate formulările investigate (1%, 3%, 5% și 10%), tendința generală arată că scăderea temperaturii conduce la creșterea vâscozității, fenomen determinat de apropierea sistemului de zona de gelificare și de întărirea rețelelor fizice formate de gelatină. Această creștere a vâscozității se reflectă direct într-o creștere proporțională a presiunii necesare pentru extrudare, ceea ce confirmă consistența dintre valorile experimentale și predicțiile modelului utilizat în platformă.

Pentru concentrațiile mici (1-3%), vâscozitatea soluțiilor prezintă variații moderate odată cu temperatura, iar presiunile necesare rămân în intervale scăzute (4,6-12,8 kPa). În aceste condiții, scăderea temperaturii de la 40°C la 4°C determină aproximativ o dublare a presiunii, ceea ce corespunde unui comportament tipic pentru soluțiile slab concentrate, la care rețeaua polimerică este suficient de flexibilă încât să răspundă rapid la modificarea temperaturii.

Pentru concentrațiile medii (5%), relația dintre presiune și vâscozitate devine mai pronunțată: la temperaturi joase, vâscozitatea crește semnificativ, iar presiunea necesară pentru extrudare ajunge la valori de 14-15 kPa. Această corelație este în concordanță cu faptul că sistemele mai concentrate dezvoltă structuri fizice mai dense, sensibile la variațiile de temperatură, ceea ce îngreunează curgerea materialului prin duză.

Cea mai accentuată dependență se observă pentru concentrația de 10%, unde vâscozitatea atinge valori ridicate la temperaturi joase (0.2103 Pa·s la 4°C), iar presiunea necesară pentru extrudare se dublează față de temperatura de 24°C (de la 12 kPa la peste 22 kPa). Această evoluție confirmă comportamentul caracteristic al gelatinelor concentrate, la care structurile fizice de tip triple-helix sunt mai stabile și mai dificil de rupt mecanic la temperaturi scăzute. În plus, chiar și la temperaturi ridicate (36-40°C), unde vâscozitatea scade, presiunile rămân mai mari decât în cazul concentrațiilor mici, reflectând densitatea rețelei polimerice.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

În ansamblu, datele arată o corelație direct proporțională între vâscozitate și presiunea necesară extrudării, validând logica fizică implementată în platformă. Astfel, presiunea crește aproape liniar odată cu creșterea vâscozității, iar în paralel influența temperaturii este cu atât mai pronunțată cu cât concentrația gelatinei este mai mare. Acest comportament confirmă faptul că modelul utilizat pentru predicția parametrilor de printare reproduce în mod realist fenomenele observate în cadrul experimentelor reologice, demonstrând aplicabilitatea platformei în optimizarea condițiilor de bioprintare și în selectarea concentrațiilor optime pentru printarea scaffoldurilor.

Tabel 1. Valorile presiuni pentru gelatină în funcție de temperatură.

Gelatină				
Temperatură	Concentrații (m/v)			
	1%	3%	5%	10%
°C				
4	11.2	12.8	14.4	22.3
8	10.2	11.6	13.1	17.4
12	9.1	10.4	11.7	15.6
16	8	9.2	10.3	13.8
20	7.3	8.4	9.5	12.6
24	7	8	9	12
28	6.3	7.2	8.1	10.8
32	5.6	6.4	7.2	9.6
36	4.9	5.6	6.3	8.4
40	4.6	5.2	5.9	7.8

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

Tabel 2. Valorile vâscozității pentru gelatină în funcție de temperatură.

Gelatină				
Temperatură	Vascozitate (Pa*s)			
°C	1%	3%	5%	10%
4	0.0386	0.0354	0.0410	0.2103
8	0.0310	0.0317	0.0404	0.0568
12	0.0227	0.0296	0.0399	0.0474
16	0.0195	0.0272	0.0360	0.0466
20	0.0191	0.0273	0.0342	0.0420
24	0.0189	0.0209	0.0325	0.0402
28	0.0172	0.0292	0.03215	0.0416
32	0.0161	0.0296	0.0228	0.0420
36	0.0152	0.0334	0.0286	0.0417
40	0.0145	0.0331	0.0298	0.0408

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

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 platformei de predicție dezvoltate pentru estimarea vâscozității și presiunii necesare extrudării hidrogelurilor pe bază de gelatină, au fost implementate o serie de relații matematice care urmăresc să reproducă tendințele reologice ale materialului în funcție de temperatură și concentrație. Modelul de vâscozitate utilizat se bazează pe o funcție compozită ce integrează trei componente principale:

(i) vâscozitatea apei la temperatura selectată, determinată printr-o funcție exponențială de forma:

$$(1) \mu_w(T) = 0.001 \cdot \exp[-0.033 (T - 20)],$$

(ii) un termen polinomial dependent de concentrație de tipul

$$(2) \eta_{raw}(c,T) = \mu_w (1 + a \cdot c^n),$$

unde a și n sunt constante empirice calibrate pentru fiecare polimer, iar c reprezintă concentrația exprimată în % w/v, și (iii) un factor de corecție aplicat atunci când temperatura se află sub temperatura critică de gelificare a gelatinei (≈ 28 °C), implementat prin relația:

$$(3) \eta = \eta_{raw} \times [1 + 0.4 (\Delta T / 10)]^2,$$

unde ΔT reprezintă diferența dintre temperatura de gelificare și temperatura de lucru. Această structură modulară permite modelului să capteze atât scăderea vâscozității odată cu creșterea temperaturii, cât și creșterea abruptă a rezistenței la curgere la temperaturi joase un fenomen caracteristic materialelor termogelificabile, precum gelatina.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

Funcția de calcul a presiunii din platformă se bazează pe o relație potențială între vâscozitate și efortul necesar extrudării, inspirată conceptual din ecuația de curgere Poiseuille, dar adaptată empiric pentru a corespunde domeniului tipic de presiuni utilizate în bioprintare. În forma utilizată, presiunea este estimată folosind două seturi de parametri în funcție de regimul de vâscozitate:

$$P(\eta) = a_1 \cdot \eta^{b_1} \text{ pentru } \eta < 1.4 \text{ Pa}\cdot\text{s}$$

și

$$P(\eta) = a_2 \cdot \eta^{b_2} \text{ pentru } \eta \geq 1.4 \text{ Pa}\cdot\text{s},$$

unde constantele (a_1, b_1) și (a_2, b_2) au fost calibrate astfel încât valorile generate să se apropie de presiunile observate experimental pentru concentrațiile 1-10% gelatină. Această abordare permite o creștere graduală a presiunii pentru intervalele de vâscozitate specifice hidrogelurilor obișnuite, evitând supraestimările care pot apărea atunci când se aplică direct modele teoretice pentru fluide Newtoniene. Pragul de 1.4 Pa·s a fost ales deoarece reprezintă zona de tranziție în care gelatina trece de la un comportament fluid la unul semigelificat, moment în care presiunea necesară pentru extrudare începe să crească mai abrupt, iar acest punct oferă și cea mai stabilă și lină separare între cele două regimuri de calcul din model [1, 2].

Deși aceste funcții reprezintă o simplificare a comportamentului reologic real al gelatinei un material seminewtonian cu proprietăți shear-thinning, microstructură dependentă de temperatură și tranziții sol-gel complexe implementarea lor reușește să surprindă direcția și dinamica generală a variațiilor de vâscozitate și presiune în funcție de temperatura și concentrația polimerului. Astfel, platforma generează valori care, chiar dacă nu sunt identice cu cele experimentale, urmăresc în mod coerent trendurile măsurate și permit utilizarea sistemului ca instrument predictiv preliminar pentru optimizarea parametrilor de bioprintare.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

Tabel 3. Valorile presiuni pentru gelatină în funcție de temperatură generate din platformă.

Gelatină				
Temperatură	Concentrații (m/v)			
°C	1%	3%	5%	10%
4	5.91	8.72	10.72	14.41
8	5.49	8.11	9.97	13.4
12	4.61	6.81	8.37	11.25
16	3.83	5.65	6.95	9.34
20	3.14	4.63	5.7	7.66
24	2.53	3.74	4.59	6.18
28	2	2.95	3.63	4.88
32	1.86	2.75	3.37	4.54
36	1.73	2.55	3.14	4.22
40	1.61	2.37	2.92	3.92

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

Tabel 4. Valorile vâscozității pentru gelatină în funcție de temperatură generate din platforma.

Gelatină				
Temperatură	Vascozitate (Pa*s)			
	1%	3%	5%	10%
°C				
4	0.01648	0.03345	0.04865	0.08328
8	0.01444	0.02931	0.04263	0.07298
12	0.01051	0.02132	0.03101	0.05309
16	0.0075	0.01522	0.02213	0.03789
20	0.00523	0.01061	0.01543	0.02641
24	0.00354	0.00718	0.01044	0.01788
28	0.0023	0.00468	0.0068	0.01164
32	0.00202	0.0041	0.00596	0.0102
36	0.00177	0.00359	0.00522	0.00894
40	0.00155	0.00315	0.00458	0.00783

În cadrul platformei AI dedicate evaluării și predicției parametrilor de printare pentru hidrogeluri, modelarea matematică a proprietăților reologice și de procesare constituie

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

elementul central care permite obținerea unor estimări coerente și reproductibile. Totodată sistemul integrează și alte funcții care simulează atât fenomene fundamentale precum variația vâscozității în funcție de temperatură și concentrație sau comportamentul curgerii în regim de extrudare cât și comportamente derivate, esențiale pentru aplicabilitatea reală în bioprintare, cum sunt viteza optimă de printare, alegerea dimensiunii acului de printare, estimarea geometriei filamentului depus și calcularea scorului global de printabilitate. Toți acești parametri sunt calculați pe baza unor relații funcții pentru a surprinde tendințele esențiale ale materialelor hidrogelice în condiții experimentale variate.

Un prim parametru calculat de platformă este molaritatea, determinată prin formula standard utilizată în chimie:

$$(5) M = (m_g / MW) / V_L, \quad mM = 1000 * M$$

unde m_g reprezintă masa în grame, MW masa moleculară a polimerului (g/mol), iar V_L volumul în litri. Deși platforma operează în principal cu concentrații exprimate ca masă/volum (% m/v), introducerea molarității permite cuantificarea unui aspect critic: densitatea locală de lanțuri polimerice. Aceasta influențează direct scorul de modelabilitate, fiindcă soluțiile foarte diluate (cu molaritate scăzută) nu pot forma structuri stabile în timpul extrudării.

Un al doilea element esențial îl reprezintă extrudabilitatea, calculată printr-o formulă inspirată din legea lui Poiseuille pentru curgerea fluidelor vâscoase în tuburi cilindrice. Debitului teoretic Q este exprimat prin:

$$(6) Q = (\pi r^4 \Delta P) / 8 \eta L,$$

unde r este raza interioară a acului de printare (m), ΔP este diferența de presiune aplicată (Pa), η vâscozitatea soluției (Pa·s), iar L lungimea duzei (m). Această relație are unitatea finală m^3/s ,

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

Însă în platformă debitul este convertit în microlitri pe secundă ($\mu\text{L/s}$) pentru a fi compatibil cu unitățile uzuale din bioprintare. Extrudabilitatea este transformată ulterior într-un scor numeric prin funcția:

$$(7) \text{ score} = 100 * \tanh(\log_{10}(Q/Q_{\text{target}}) + 1),$$

unde Q_{target} reprezintă debitul teoretic necesar pentru a genera o linie continuă la viteza de printare estimată. Funcția $\tanh()$ comprimă valorile extreme, evitând instabilități numerice și permițând o interpretare intuitivă (0-100).

O componentă critică pentru stabilitatea structurală a scaffoldului, evaluată printr-un model de tip gaussian care compară vâscozitatea obținută cu o valoare ideală:

$$(8) \text{ score}_{\text{shape}} = 100 * \exp[-((\log_{10}(n/n_{\text{ideal}}))/0.9)^2]$$

Prin acest model se poate observa clar comportamentul gelurilor: atunci când vâscozitatea este prea mică, stratul se „lățește” și se deformează, iar când este prea mare, extrudarea devine neregulată. În paralel, platforma estimează rezoluția prin calculul lățimii liniei extrudate, folosind relația:

$$(9) w_{\text{exp}} = d_{\text{nozzle}} + (w_{\text{geom}} - d_{\text{nozzle}}) * f_{\text{spread}},$$

unde w_{geom} este lățimea geometrică determinată din debit, iar f_{spread} (între 0.2 și 1) reflectă tendința materialelor de a se extinde după depunere. Scorul de rezoluție este apoi calculat prin:

$$(10) \text{ score}_{\text{res}} = 100 * \exp[-(w_{\text{exp}}/1.2 d_{\text{nozzle}} - 1)^2/0.15]$$

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

Platforma generează și oviteză recomandată de printare, estimată din regimurile observate pentru geluri supramoleculare, unde vâscozitățile mici permit viteze mari, iar cele ridicate impun viteze mici. Funcția implementată împarte materialele în patru zone reologice, cu valori între 2 și 15 mm/s, ceea ce corespunde practicii experimentale din bioprintarea termogelurilor. O funcționalitate suplimentară importantă este selecția acului optim de printare, determinată preponderent pe baza presiunii necesare pentru extrudare. Diametrul acului (exprimat în gauge G) scade atunci când presiunea este mare, pentru a păstra un regim de curgere controlat și a reduce riscul de blocaje. Funcția se structurează astfel:

$P > 80 \text{ kPa} = 20\text{-}16\text{G}$,

$40 < P < 80 \text{ kPa} = 25\text{-}22\text{G}$,

$20 < P > 40 \text{ kPa} = 27\text{-}30\text{G}$,

$20 < P = 32\text{-}40\text{G}$,

Ulterior, scorul de modelability ajustează selecția dacă materialul este fie prea fluid, fie prea vâscos pentru geometria indicată.

Toți acești parametri sunt sintetizați într-un scor global al printabilității, calculat prin media aritmetică a scorurilor pentru extrudabilitate, shape retention și rezoluție:

$$(11) \text{score}_{\text{overall}} = (\text{score}_{\text{extrude}} + \text{score}_{\text{shape}} + \text{score}_{\text{res}}) / 3$$

Interpretarea finală a acestui scor se aliniază standardelor utilizate în fabricarea scaffoldurilor 3D, unde valori peste 75 sugerează obținerea unor structuri cu fidelitate ridicată, în timp ce scorurile sub 45 indică necesitatea recalibrării materialului sau a parametrilor de printare.

Prin aceste funcții, platforma reușește să ofere o estimare coerentă și adaptabilă a comportamentului hidrogelurilor în timpul bioprintării, integrând în mod elegant concepte precum curgerea la presiune, tranzițiile termice, stabilitatea geometrică și fezabilitatea procesului, cu scopul de a optimiza printarea scaffoldurilor din diferiți polimeri.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

II.1.1.1. Concluzii:

Rezultatele obținute în urma experimentelor reologice și a testelor de extrudare pentru gelatina la concentrații cuprinse între 1% și 10%, corelate ulterior cu valorile generate de platformă, permit formularea unor concluzii importante în ceea ce privește validarea modelelor matematice implementate și aplicabilitatea lor în optimizarea procesului de bioprintare.

În primul rând, datele experimentale confirmă comportamentul puternic dependent de temperatură al gelatinei, evidențiat printr-o creștere semnificativă a vâscozității pe măsură ce temperatura scade, fenomen observat în mod particular la concentrațiile ridicate. De exemplu, la 10% gelatină, vâscozitatea măsurată la 4 °C atinge valoarea de 0.2103 Pa·s, în timp ce la 24 °C aceasta scade la 0.0402 Pa·s, reducându-se de peste cinci ori. Această evoluție se reflectă direct în presiunea necesară extrudării, care crește de la 12 kPa la 24 °C până la 22.3 kPa la 4 °C. Aceste valori demonstrează importanța menținerii unui control strict al temperaturii în timpul procesului de printare, deoarece materialele termogelificabile reacționează accentuat la variațiile termice.

Compararea valorilor experimentale cu cele generate de platformă arată că modelul matematic implementat reproduce în mod consecvent tendințele generale ale datelor reale, chiar dacă magnitudinea valorilor nu este identică. De exemplu, pentru 5% gelatină la 4 °C, presiunea experimentală este de 14.4 kPa, în timp ce platforma estimează 10.72 kPa; la 24 °C, valorile sunt de 9 kPa experimentale și 4.59 kPa estimate. În cazul vâscozității, platforma prezintă o subestimare sistematică a valorilor reale, dar păstrează fidel trendul descrescător cu temperatura. Astfel, pentru concentrația de 10%, valorile reale sunt de 0.2103 Pa·s la 4 °C și 0.0402 Pa·s la 24 °C, în timp ce platforma generează 0.08328 Pa·s, respectiv 0.01788 Pa·s.

Această deviație este explicabilă prin faptul că modelul implementat folosește o aproximare generală pentru polimerii termogelificabili, bazată pe un set limitat de constante empirice și pe un termen de corecție al gelificării simplificat. Cu toate acestea, în ciuda diferențelor cantitative, corelația dintre valorile reale și cele simulate rămâne puternică,

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

deoarece traiectoriile de variație sunt similare. Astfel, creșterea vâscozității la temperaturi scăzute și scăderea acesteia la temperaturi ridicate sunt surprinse corect pentru toate cele patru concentrații, ceea ce demonstrează capacitatea modelului de a anticipa comportamentul general al materialului în condiții variate.

Un alt aspect important este faptul că și valorile reale prezintă abateri față de un trend perfect liniar, în special la 3% și 5% gelatină, unde vâscozitățile măsurate la 28–36 °C oscilează ușor în jurul valorilor așteptate. Astfel, la 3% gelatină, vâscozitatea crește neașteptat la 36 °C (0.0334 Pa·s), depășind valoarea de la 24 °C (0.0209 Pa·s). Aceste comportamente reflectă complexitatea rețelelor de gelatină aflate în tranziție termică și subliniază dificultatea realizării unui model perfect predictiv pe baza unui set limitat de date. Este relevant faptul că platforma reproduce și aceste oscilații moderate, unde valorile generate nu scad perfect monoton, ci mențin același profil global de variație.

În ceea ce privește presiunea de extrudare, diferențele între valorile reale și cele generate tind să fie constante și proporționale, ceea ce sugerează că modelul implementat este bine calibrat în ceea ce privește forma funcției, dar necesită ajustări suplimentare pentru scalare. De exemplu, la 3% gelatină, presiunea reală la 12 °C este 10.4 kPa, în timp ce platforma estimează 6.81 kPa, menținând totuși aceeași proporție între temperaturile succesive. Acest comportament demonstrează că forma potențială a funcției $P(\eta)$ este adecvată, însă valorile constante a_1 , b_1 , a_2 și b_2 pot fi recalibrate pentru a reproduce mai bine magnitudinea observată în practică.

În ansamblu, se poate concluziona că platforma reflectă în mod corect și robust tendințele reologice și de extrudare ale gelatinei, oferind un instrument predictiv valoros în fazele timpurii ale dezvoltării formulărilor pentru bioprintare. Cu toate că valorile absolute necesită ajustări suplimentare, fidelitatea trendurilor permite utilizarea platformei pentru selecția preliminară a intervalelor optime de temperatură și concentrație, reducând numărul experimentelor necesare. În contextul proiectului REOSTEOMi, acest lucru contribuie direct

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

la accelerarea procesului de optimizare a hidrogelurilor destinate fabricării scaffoldurilor personalizate pentru regenerarea osoasă.

În final, având în vedere diferențele dintre valorile reale și cele predictibile, se recomandă o etapă ulterioară de recalibrare a funcțiilor reologice, incluzând extinderea setului de date experimentale, introducerea unui model shear-thinning dedicat gelatinei și ajustarea constantelor empirice. Implementarea acestor optimizări va permite platformei să genereze valori mult mai apropiate de cele reale și să devină un instrument predictiv și mai precis pentru utilizarea în bioprintarea avansată.

Referințe:

[1] J. Malda *et al.*, “25th Anniversary Article: Engineering Hydrogels for Biofabrication,” *Advanced Materials*, vol. 25, no. 36, pp. 5011–5028, 2013.

[2] H. Ouyang, R. Yao, Y. Zhao, and W. Sun, “Effect of bioink properties on printability and cell viability for 3D bioplotting of embryonic stem cells,” *Biofabrication*, vol. 8, no. 3, p. 035020, 2016.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

PARTEA III

III.1. CAPITOL 1

III.1.1. Sinteza de formulări printabile adecvate pentru bioprintare 3D cu celule

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

Subactivitatea 1.5. Studii preliminare de printare 3D pe 5 axe (penta-axiala)

Subactivitatea 1.7. Studiul biodisponibilității agenților terapeutici și conservarea caracteristicii 4D a formulărilor printabile.

III.1.1.1. Introducere

Bioprintarea reprezintă o abordare avansată de biofabricare care permite generarea de structuri tridimensionale adaptate aplicației, prin utilizarea unor bioformulări printabile ce integrează celule vii și materiale cu proprietăți biomimetice [1]. Această tehnologie oferă un control spațial precis asupra distribuției celulare și a componentelor materiale, aspect esențial pentru aplicațiile de inginerie tisulară, inclusiv în contextul regenerării țesutului osos. Dintre tehnicile disponibile, bioprintarea prin extrudare este utilizată pe scară largă datorită robusteții și versatilității sale, procesul bazându-se pe depunerea strat-cu-strat a bioformulărilor pentru obținerea unor structuri implantabile [2]. Aceste constructe pot fi proiectate astfel încât să reproducă, într-o măsură funcțională, comparabile cu cele ale țesutului nativ, pentru a susține migrarea și proliferarea celulară, precum și difuzia eficientă a nutrienților și a oxigenului [3]. Aceste caracteristici sunt determinante pentru sinteza și organizarea matricei extracelulare, procese centrale în refacerea funcțională a țesutului osos. arhitectura și comportamentul mecanic ale osului afectat. Suporturile celulare destinate regenerării osoase trebuie să prezinte o porozitate interconectată, biocompatibilitate ridicată și proprietăți mecanice comparabile cu cele ale țesutului nativ, pentru a susține migrarea și proliferarea celulară, precum și difuzia eficientă a nutrienților și a oxigenului. Aceste caracteristici sunt determinante pentru sinteza și organizarea matricei extracelulare, procese centrale în refacerea funcțională a țesutului osos [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

Reticularea cu genipin și clorură de calciu reprezintă o strategie combinată utilizată frecvent pentru stabilizarea hidrogelurilor pe bază de polimeri naturali, în special în sisteme destinate ingineriei tisulare. Genipinul, un agent de reticulare de origine naturală extras din *Gardenia jasminoides*, reacționează predominant cu grupările amino libere ale polimerilor precum gelatina, colagenul sau chitosanul, formând legături covalente stabile. Acest tip de reticulare conduce la creșterea rigidității mecanice și a rezistenței la degradare enzimatică, menținând în același timp un profil de citotoxicitate semnificativ mai redus comparativ cu agenții de reticulare sintetici clasici [5].

Clorura de calciu (CaCl_2) acționează prin mecanism ionic, fiind utilizată în principal pentru reticularea polimerilor anionici, precum alginatul, prin formarea de punți ionice între lanțurile polimerice. Reticularea indusă de ionii Ca^{2+} este rapidă și reversibilă, permițând ajustarea fină a proprietăților reologice și structurale ale hidrogelurilor. Combinarea genipinului cu clorura de calciu într-un sistem hibrid permite obținerea unor rețele dublu-reticulate, în care interacțiunile ionice asigură stabilizare inițială, iar legăturile covalente conferă integritate structurală pe termen lung. Această abordare este deosebit de relevantă pentru bioprintare și regenerare osoasă, unde sunt necesare atât fidelitate geometrică imediată, cât și proprietăți mecanice adecvate pentru susținerea activității celulare [6].

Utilizarea în formulări a oxidului de grafenă funcționalizat cu grupări carboxil (COOH-GO) reprezintă o metodă de biofuncționalizare a materialelor. Această funcționalizare crește hidrofilitatea și stabilitatea coloidală în medii apoase, facilitând dispersia uniformă în hidrogeluri și bioink-uri utilizate în bioprintare [7]. Prezența grupărilor carboxil permite interacții electrostatice și legături de hidrogen cu polimeri naturali sau sintetici, precum gelatină, alginat sau polietilen glicol, contribuind la îmbunătățirea proprietăților mecanice și a integrității structurale a constructelor [8]. În aplicații de inginerie tisulară, COOH-GO este investigat ca agent de ranforsare și ca suport bioactiv, datorită capacității sale de a modula

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

adeziunea celulară și de a susține diferențierea osteogenică, fără a compromite semnificativ viabilitatea celulară la concentrații controlate [9] .

În acest raport prezentăm obținerea a trei compoziții bazate pe polimeri diferiți, fiecare conținând atât probe control, cât și formulări nanocompozite complexe. Prima compoziție testată s-a bazat pe o formulare de bază cu gelatină, K-caragenan și gelan, în care s-au adăugat nanofibre de celuloză (CNF) și COOH-GO pentru îmbunătățirea proprietăților reologice, mecanice și biologice. Pentru a doua compoziție s-a ales eliminarea gelanului din compoziția anterioară datorită necesității unor temperaturi mai de procesare pentru solubilizarea acestuia. Cea de-a treia compoziție a prezentat o formulare de bază diferită, din alginat și K-caragenan, unde s-a utilizat spirulina ca agent de îmbunătățire a stabilității, vâscozității și proprietăților biologice.

III.1.1.2. Materiale și sinteză

III.1.1.2.1. Formulare printabilă pe bază de gelatină, K-caragenan, gumă gelan, nanofibre de celuloză, oxid de grafenă funcționalizat cu grupări carboxil și celule MG63
Activitatea 1. Printarea 3D în condiții speciale de substituenți osoși personalizați.

Subactivitatea 1.5. Studii preliminare de printare 3D pe 5 axe (penta-axiala)

Materiale

Gelatina din piele de pește, guma gelan (GelzanTM CM), K-caragenanul, COOH-GO au fost achiziționate de la Sigma-Aldrich. CNF oxidate cu 2,2,6,6-tetrametil-1-piperidinyloxy (TEMPO) au fost achiziționate de la Novarials Co. (Woburn, MA).

Sinteza formulărilor printabile

Pentru a testa capacitatea formulărilor de a susține bioprintarea alături de celule, s-au selectat 3 formulări, având la bază o compoziție de gelatină, gumă gelan și K-caragenan. Pentru modularea proprietăților reologice, de stabilitate și biocompatibilitate, două formulări au fost modificate prin adăugarea CNF-urilor (GGKC) și prin adăugarea unei combinații de CNF-uri 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

COOH-GO (GGKC-GO). Codificările și concentrațiile utilizate sunt prezentate în Tabelul 1.

Toate probele obținute vor fi reticulate succesiv cu clorură de calciu (CaCl_2) și genipin.

Tabelul 1. Codificarea probelor și concentrațiile materialelor utilizate.

Proba	Gelatină	Guma gelan	K-caragenan	CNF	COOH-GO*	Reticulare cu CaCl_2 2%	Reticulare cu genipin 1%
GGK	6%	4 %	1.2%	-	-	5 min	24 h
GGKC	6%	4 %	1.2%	2.1%	-	5 min	24 h
GGKC-GO	6%	4 %	1.2%	2.1%	0.125%*	5 min	24 h

* raportat la concentrația polimerilor

Procesul de sinteza s-a realizat integral în hota cu flux laminar vertical pentru a asigura un mediu aseptice. De asemenea, toate materialele și ustensilele utilizate au fost sterilizate anterior cu radiație UV timp de 30 de minute pe fiecare suprafață. Gelatina a fost adăugată în soluțiile cu CNF-uri sau COOH-GO dispersate prin ultrasonare pentru formulările GGKC și respectiv GGKC-GO. Pentru soluția control, GGK, gelatina a fost adăugată direct în apă ultrapură, iar omogenizarea timp de o oră s-a realizat la 40°C pentru toate formulările. Guma gelan și K-caragenanul au fost adăugate succesiv la temperatura de 50°C cu omogenizare o oră după adăugarea fiecărei componente.

III.1.1.2.2. Formulare printabilă pe bază de gelatină, K-caragenan, nanofibre de celuloză, oxid de grafenă funcționalizat cu grupări carboxil și celule MG63

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

Subactivitatea 1.5. Studii preliminare de printare 3D pe 5 axe (penta-axiala)

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

Materiale

Gelatina din piele de pește, K-caragenanul, COOH-GO au fost achiziționate de la Sigma-Aldrich. CNF oxidate cu TEMPO au fost achiziționate de la Novarials Co. (Woburn, MA). De asemenea, linia celulară MG63 a fost achiziționată de la Cytion, Cell Line Service (CLS; Eppelheim, Germany) și menținută prin pasaje succesive, precum s-a detaliat în rapoartele anterioare. Mediul de cultură Dulbecco's Modified Eagle (DMEM), serul fetal bovin (FBS), penicilina-streptomicina (P-S), albastrul tripan, tripsina și pachetele pentru obținerea soluției saline cu fosfat (PBS) au fost furnizate de Thermo Scientific (Waltham, USA). Pentru suplimentarea mediului de cultură s-a adăugat o concentrație de 10% FBS și 1% P-S. De asemenea, PBS-ul obținut a fost filtrat cu ajutorul unui filtru de 0.2 μm, pentru a asigura sterilizarea acestuia.

Sinteza formulărilor printabile

Pentru evaluarea capacității formulărilor de a susține procesul de bioprintare în prezența celulelor, au fost selectate două formulări bazate pe o compoziție de gelatină, K-caragenan și CNF-uri. În vederea modulării proprietăților reologice, a stabilității și a biocompatibilității, una din formulări va fi îmbunătățită prin adăugare de COOH-GO (GKC-GO). Codificările și concentrațiile utilizate sunt prezentate în **Tabelul 2**. Toate probele obținute vor fi supuse unei reticulări succesive cu clorură de calciu (CaCl₂) și genipin.

Tabelul 2. Codificarea probelor și concentrațiile materialelor utilizate.

Proba	Gelatină	K-caragenan	CNF	COOH-GO*	Reticulare cu CaCl ₂ 2%	Reticulare cu genipin 1%
GKC	6%	1.2%	2.1%	-	5 min	24 h
GKC-GO	6%	1.2%	2.1%	0.125%*	5 min	24 h

* raportat la concentrația polimerilor

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

Procesul de sinteza s-a realizat integral în hota cu flux laminar vertical pentru a asigura un mediu aseptice. De asemenea, toate materialele și ustensilele utilizate au fost sterilizate anterior cu radiație UV timp de 30 de minute pe fiecare suprafață. Gelatina a fost adăugată într-o soluție conținând mediu de cultură complet și CNF-uri pentru probele GKC, iar pentru GKC-GO într-o soluție conținând DMEM suplimentat, CNF-uri și dispersia COOH-GO. Omogenizarea gelatinei timp de o oră s-a realizat la 40°C pentru toate formulările, iar K-caragenanul a fost omogenizat la 50°C timp de o oră.

Pregătirea suspensiei celulare și însămânțare în formulările printabile

Pentru fiecare formulare printabilă s-a utilizat un flacon de 75 cm² conținând cultura celulară MG63 ajunsă la confluență. Din fiecare recipient s-a scos mediul de cultură conținut și s-au spălat cu 5 ml PBS de două ori pentru a elimina complet mediul de cultură. Pentru desprinderea celulelor aderente s-au adăugat câte 2 ml de tripsină și s-au incubat recipientele în condiții standard (37°C, 5% CO₂, 90% umiditate), timp de 3 minute. După desprindere, s-au adăugat câte 6 ml mediu suplimentat în fiecare flacon pentru inactivarea tripsinei și s-au transferat suspensiile celulare în tuburi pentru centrifugare. După centrifugarea la 1300 rpm timp de 3 minute a suspensiilor celulare, s-a eliminat supernatantul și s-a adăugat 1 ml de mediu suplimentat. Pentru determinarea numărului de celule conținut, într-un tub Eppendorf s-au adăugat 10 μl suspensie alături de 10 μl albastru tripan. Am ales însămânțarea unei densități celulare de 5 × 10⁶ celule/formulare. Formularea printabilă cu celule obținută a fost transferată într-un cartuș steril de 3 mL, cu un vârf steril, protejat de un vârf de micropipetă pentru a reduce riscul contaminării.

Bioprintarea 3D în condiții aseptice

Fiecare cartuș conținând formularea printabilă cu celule a fost transferat în bioimprimanta 3D BIO X6 (Cellink, Gothenburg, Suedia). Pentru a garanta sterilitatea

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

procesului, incinta bioimprimantei a fost sterilizată înaintea testării fiecărei formulări printabile, utilizând radiații UV timp de 30 de minute și o soluție de etanol 70%. Bioprintarea a fost realizată direct în plăci cu godeuri sterile. Pentru procesul de bioprintare s-au selectat vârfuri sterile cu un diametru interior de 330 μm , la o temperatură controlată de 37°C. Modelul selectat a fost de 10 \times 10 \times 1 mm cu o densitate de umplere de 25%. S-au folosit diferite variații ale presiunii de extrudare și vitezei de printare, ajustate pentru fiecare formulare pentru a asigura formarea structurilor fără afectarea viabilității celulare. Parametrii de printare utilizați sunt ilustrați în **Tabelul 3**. Pentru reticularea structurilor bioprintate, s-a ales o strategie de dublă reticulare, cu CaCl₂ 2% timp de 5 minute și în mediu cu 0.5% genipin timp de 24 h. Astfel, structurile bioprintate au fost transferate în hota cu flux laminar vertical unde au fost imersate în soluția de CaCl₂, iar apoi în DMEM suplimentat și conținând 0.5% genipin, iar apoi incubate în condiții standard pentru 24 de ore. Pentru proba control GKC s-a realizat un set reticulat doar cu CaCl₂, pentru a investiga efectul genipinului asupra viabilității celulare.

Tabelul 3. Parametrii de bioprintare 3D a formulărilor cu celule.

Cod	Lungime \times Lățime \times Înălțime (mm \times mm \times mm)	Temperatură (°C)	Presiune de extrudare (kPa)	Viteză de printare (mm s ⁻¹)
GKC	10 \times 10 \times 1	37°C	80-150	7
GKC-GO			100-200	7

Testarea viabilității celulare prin Live/Dead

Testarea viabilității celulare s-a realizat la o zi de incubare a probelor în mediu prin realizarea unui test Live/Dead. Din fiecare godeu a fost scos mediul de cultură, iar fiecare probă a fost spălată cu 2 ml PBS de două ori. S-a utilizat kitul Live/Dead furnizat de Thermo

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

Scientific (Waltham, USA), iar pentru obținerea soluției s-au adăugat 5 μ l calceină AM și 20 μ l etidium homodimer-1 în 10 mL PBS. Astfel, s-a adăugat câte 2 ml soluție Live/Dead în fiecare godeu și s-au incubat plăcile la temperatura camerei pentru 40 de minute. După incubare, soluția a fost scoasă din godeuri, probele s-au spălat cu PBS, iar în godeuri s-au adăugat 2 ml PBS pentru a permite vizualizarea probelor marcate cu ajutorul microscopului cu fluorescență DMIL LED Fluo cu sistem DFC450-C (Leica, Germany).

III.1.1.2.3. Formulare printabilă pe bază de K-caragenan, alginat, spirulina și celule MG63

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

Subactivitatea 1.7. Studiul biodisponibilității agenților terapeutici și conservarea caracteristicii 4D a formulărilor printabile.

Materiale

K-caragenanul, alginatul de sodiu, CaCl_2 și clorura de potasiu (KCl) au fost achiziționate de la Sigma-Aldrich, iar spirulina sub formă de pulbere uscată ce provine de la compania Spring Markt, a fost procurată de la o farmacie locală (Dr. Max). Linia celulară MG63 a fost achiziționată de la Cytion, Cell Line Service (CLS; Eppelheim, Germany) și menținută prin pasaje succesive, precum s-a detaliat în rapoartele anterioare. Mediul de cultură DMEM, FBS-ul, P-S, albastrul tripan, tripsina și pachetele pentru PBS au fost furnizate de Thermo Scientific (Waltham, USA). Mediul de cultură complet suplimentat a fost obținut prin adăugarea unei concentrații de 10% FBS și 1% P-S, iar PBS-ul a fost sterilizat prin utilizarea unui filtru de 0.2 μ m.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

Sinteza formulărilor printabile

În scopul evaluării capacității de bioprintare în prezența celulelor MG63, s-au sintetizat două formulări polimerice pe bază de K-caragenan și alginat de sodiu (KA). Pentru a optimiza caracteristicile reologice, stabilitatea fizică și compatibilitatea biologică, una dintre formulări va fi îmbunătățită prin încorporarea unei anumite cantități de spirulină (KA/sp-0.5). Procesul de sinteză s-a realizat integral în hota cu flux laminar vertical pentru a asigura un mediu aseptice. De asemenea, toate materialele și ustensilele utilizate au fost sterilizate anterior cu radiații UV timp de 30 de minute pe fiecare suprafață. Metoda de obținere a formulărilor printabile presupus solubilizarea separată a K-caragenanului și a alginatului de sodiu cu CaCl₂ în apă ultrapură filtrată, timp de o oră; solubilizările au avut loc pe băi de apă încălzite la 80°C pentru soluția de K-caragenan, respectiv la 60°C pentru soluția de alginat de sodiu (**Figura 4**), apoi soluțiile astfel obținute s-au amestecat în rapoarte bine stabilite pentru a obține formularea KA, apoi s-a dispersat spirulina sub formă de pulbere prin agitare magnetică pentru obținerea formulării KA/sp-0.5. Codificările și concentrațiile utilizate sunt prezentate în **Tabelul 4**. Probele obținute au fost supuse unei reticulări ionice prin imersare într-o soluție ce conține 1% CaCl₂ și 1% KCl timp de 10 minute.

Tabelul 4. Codificarea probelor și concentrațiile materialelor utilizate.

Cod formulare	Lungime × Lățime × Înălțime (mm × mm × mm)	Temperatură (°C)	Presiune de extrudare (kPa)	Viteză de printare (mm s ⁻¹)
KA	10 × 10 × 0.5	37°C	40 – 50	8 – 13.5
KA/sp-0.5			40 – 75	10 – 14.5

* raportat la volumul soluției

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

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. Sinteza formulărilor pe bază de alginat, K-caragenan și spirulină în condiții sterile pentru bioprintare 3D.

Pregătirea suspensiei celulare și însămânțare în formulările printabile

Pentru fiecare compoziție destinată bioprintării a fost utilizată o cultură celulară MG63 cultivată într-un flacon de 75 cm² până la atingerea unei confluente avansate (90–95%). Pentru pregătirea suspensiei celulare s-a înlăturat mediul de cultură din fiecare recipient și s-a spălat cu câte 5 mL PBS de două ori în scopul eliminării complete a mediului de cultură vechi. Pentru a desprinde celulele aderente, s-au adăugat câte 2 mL tripsină și s-au incubat recipientele în condiții standard, timp de 3 minute. După ce s-a asigurat desprinderea celulelor, s-au adăugat câte 6 mL mediu suplimentat în fiecare recipient pentru inactivarea tripsinei și s-au transferat suspensiile celulare în tuburi de centrifugă. Centrifugarea s-a realizat la 1300 rpm timp de 3 minute, urmată de eliminarea supernatantului și adăugarea a 300 μL mediu suplimentat. Determinarea numărului de celule conținut s-a realizat prin adăugarea într-un tub Eppendorf a 10 μl suspensie alături de 10 μl albastru tripan. S-a ales însămânțarea unei densități celulare de 5×10^6 celule/formulare. Încorporarea celor 300 μL mediu cu conținut de celule în formulările printabile s-a efectuat în condiții blânde de agitare magnetică pentru a minimiza stresul mecanic, obținându-se un amestec omogen cu proprietăți reologice adecvate pentru procesul de bioprintare 3D. Formularea printabilă cu celule a fost transferată într-un cartuș

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

steril de 3 mL, prevăzut cu un ac metalic steril, protejat de un vârf de micropipetă pentru a reduce riscul contaminării.

Bioprintarea 3D în condiții aseptice

Fiecare cartuș umplut cu formularea printabilă ce conține celule a fost transferat în bioimprimanta 3D BIO X6, a cărei incintă a fost în prealabil curățată și dezinfectată cu o soluție de etanol 70% și sterilizată utilizând radiații UV timp de 30 de minute, înaintea testării fiecărei formulări printabile, pentru a garanta sterilizarea procesului. Bioprintarea 3D s-a realizat direct în plăci cu godeuri sterile, la o temperatură controlată de 37°C, și pentru care s-au selectat acele sterile cu un diametru interior de 330 μm. Modelul ales a corespuns unui pătrat cu dimensiunile de 10 × 10 × 0.5 mm (2 straturi) și cu o densitate de umplere de 25%. Parametrii atribuiți procesului de bioprintare precum presiunea și viteza de extrudare au fost optimizați pentru fiecare formulare în parte, astfel încât să se asigure formarea bio-structurilor printate fără afectarea viabilității celulare. Intervalele de valori ale parametrilor de printare utilizați sunt ilustrate în **Tabelul 5**. Pentru reticularea structurilor bioprintate, s-a ales o strategie de reticulare ionică, utilizând atât ioni de calciu, cât și ioni de potasiu, pentru a eficientiza procesul de reticulare al ambelor polizaharide (K-caragenan și alginat de sodiu). Astfel, structurile bioprintate au fost transferate în hota cu flux laminar vertical, unde au fost inițial imersate în soluția de 1% CaCl₂ și 1% KCl timp de 10 minute și apoi în DMEM suplimentat, unde au fost lăsate la incubat în condiții standard pentru 24 de ore.

Tabelul 5. Parametrii de bioprintare 3D a formulărilor cu celule.

Cod formulare	Lungime × Lățime × Înălțime (mm × mm × mm)	Temperatură (°C)	Presiune de extrudare (kPa)	Viteză de printare (mm s ⁻¹)
KA	10 × 10 × 0.5	37°C	40 – 50	8 – 13.5
KA/sp-0.5			40 – 75	10 – 14.5

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

Testarea viabilității celulare prin Live/Dead

Viabilitatea celulară a fost evaluată după trei zile de incubare a probelor bioprintate în DMEM suplimentat prin aplicarea testului calitativ Live/Dead. Din fiecare godeu a fost scos mediul de cultură, iar fiecare probă a fost spălată cu câte 2 mL PBS de două ori. Pentru acest test, s-a utilizat kitul Live/Dead, care a fost achiziționat de la Thermo Scientific, iar soluția Live/Dead a fost preparată prin adăugarea a 5 μl calceină AM și 20 μl etidium homodimer-1 în 10 mL PBS. Din soluția astfel preparată s-au adăugat câte 2 mL în fiecare godeu și s-au incubat plăcile la temperatura camerei pentru 40 de minute. După incubare, soluția a fost îndepărtată din godeuri, probele s-au spălat cu PBS, apoi s-au adăugat câte 2 mL PBS în fiecare godeu pentru a permite vizualizarea probelor marcate cu ajutorul microscopului cu fluorescență DMIL LED Fluo cu sistem DFC450-C.

III.1.1.3. Rezultate și discuții

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

Subactivitatea 1.5. Studii preliminare de printare 3D pe 5 axe (penta-axiala)

Subactivitatea 1.7. Studiul biodisponibilității agenților terapeutici și conservarea caracteristicii 4D a formulărilor printabile.

III.1.1.3.1. Formularea printabilă pe bază de gelatină, K-caragenan, gumă gelan, nanofibre de celuloză, oxid de grafenă funcționalizat cu grupări carboxil și celule MG63

Cele trei formulări bazate pe compoziția cu gelatină, K-caragenan, gumă gelan, CNF-uri și COOH-GO au prezentat dificultăți în timpul sintezei. Adăugarea gumei gelan, pentru îmbunătățirea comportamentului reologic și a stabilității post-printare, a dus la formarea de aglomerate care nu au permis extrudarea la presiuni scăzute, așa cum este necesar într-un proces de bioprintare cu celule. Gelanul, care a fost solubilizat la temperaturi mai ridicate, a dus la o gelifiere rapidă odată cu scăderea temperaturii la 37°C pentru includerea celulelor. Astfel, s-au format aglomerări ce nu au permis extrudarea materialului prin duzele de 330-510

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

μm. Datorită acestor rezultate s-a decis excluderea gumei gelan din formulările printabile și obținerea unor noi sinteze de bioprintare.

III.1.1.3.2. Formularea printabilă pe bază de gelatină, K-caragenan, nanofibre de celuloză, oxid de grafenă funcționalizat cu grupări carboxil și celule MG63

Compoziția pe bază de gelatină, K-caragenan, CNF-uri și COOH-GO a fost testată anterior pentru validarea proprietăților reologice și fidelității de printare. Rezultatele obținute au validat compatibilitatea sa pentru utilizarea în aplicații de bioprintare 3D. Cu toate acestea, pentru a asigura o viabilitate celulară ridicată post-printare, s-a ales înlocuirea apei ultrapure utilizată ca mediu de solubilizare cu DMEM suplimentat cu FBS și P-S. Prin excluderea gumei gelan s-au obținut formulări cu o vâscozitate adecvată la temperatura de 37°C. Ambele formulări, GKC și GKC-GO, au fost încărcate în cartușul de printare după adăugarea celulelor (**Figura 5-A**) în compoziție. În **Figura 5-B** se pot observa cele două cartușe conținând formulările printabile cu celule, care au fost montate în bioimprimanta 3D BIO X6 (**Figura 5-C**). În timpul procesului de bioprintare viteza de printare a fost menținută constantă (7 mm s^{-1}), iar presiunea de extrudare a fost variată pentru determinarea parametrilor optimi. Cu toate acestea, s-au înregistrat dificultăți în obținerea unei fidelități de printare, pentru ambele formulări, așa cum se poate observa în **Figura 5-D**. O posibilă explicație pentru modificarea comportamentului de printare al formulărilor comparativ cu testările anterioare constă în înlocuirea solventului inițial, reprezentat de apa ultrapură, cu mediul de cultură DMEM suplimentat. Acest mediu complex conține săruri anorganice, aminoacizi, vitamine și proteine serice, care pot influența semnificativ interacțiunile fizico-chimice dintre componentele polimerice ale formulării. În special, prezența ionilor divalenți și a proteinelor poate altera gradul de hidratare și de asociere moleculară al gelatinei, K-caragenanului și CNF-urilor, conducând la modificări ale vâscozității și a comportamentului de tip *shear-thinning*. În plus și grupările funcționale din COOH-GO pot interacționa diferit cu constituenții mediului DMEM comparativ cu apa ultrapură.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

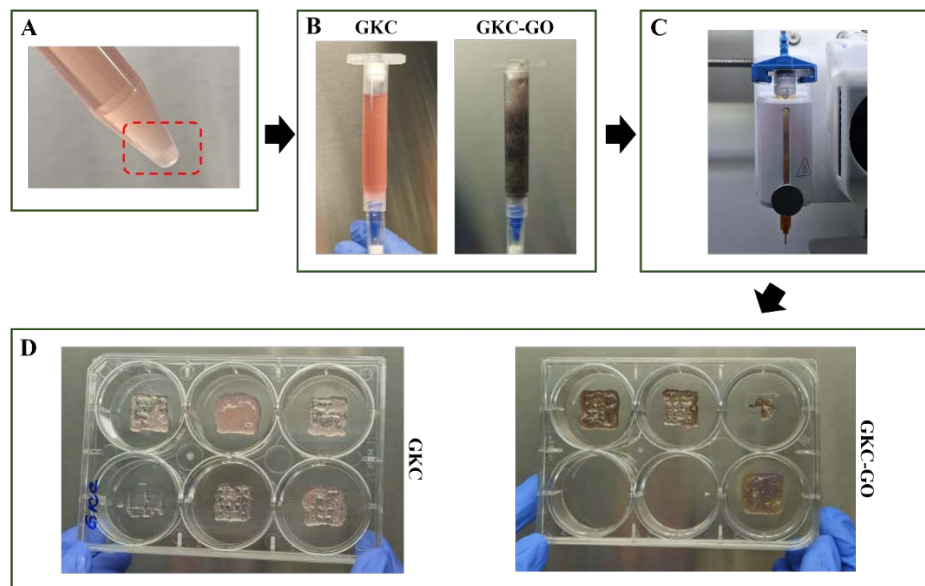


Figura 5. Bioprintarea formulărilor pe bază de gelatină, K-caragenan, CNF-uri, COOH-GO și celule MG63. Celulele MG63 înainte de însămânțarea în formularea printabilă (A). Cartușele conținând cele două formulări însămânțate cu celule (B). Montarea cartușului în instalația de bioprintare Cellink (C). Probele bioprintate cu cele două formulări (D).

Pentru formularea control, GKC, s-a obținut un lot în care nu s-a folosit genipin pentru reticulare pentru a se investiga efectul acestui agent asupra viabilității celulare post-reticulare. Astfel, cele 3 seturi de probe au fost investigate prin marcarea Live/Dead la o zi după bioprintare, iar imaginile obținute sunt prezentate în **Figura 6**. Analiza viabilității celulare nu a evidențiat diferențe semnificative între cele trei seturi de probe investigate. Imaginile obținute prin marcarea Live/Dead indică o predominanță clară a celulelor viabile, evidențiate prin colorație verde, în timp ce un număr redus de celule neviabile, colorate în roșu, a fost observat în toate probele analizate. Aceste rezultate sugerează că atât compoziția formulărilor, cât și parametrii selectați pentru procesul de bioprintare permit menținerea unei viabilități celulare ridicate. Mai mult, comparația dintre probele reticulate cu genipin și cele nereticulate, indică faptul că procesul de reticulare cu 0.5% genipin în mediu de cultură nu induce un efect citotoxic semnificativ asupra celulelor MG63 în condițiile experimentale utilizate.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

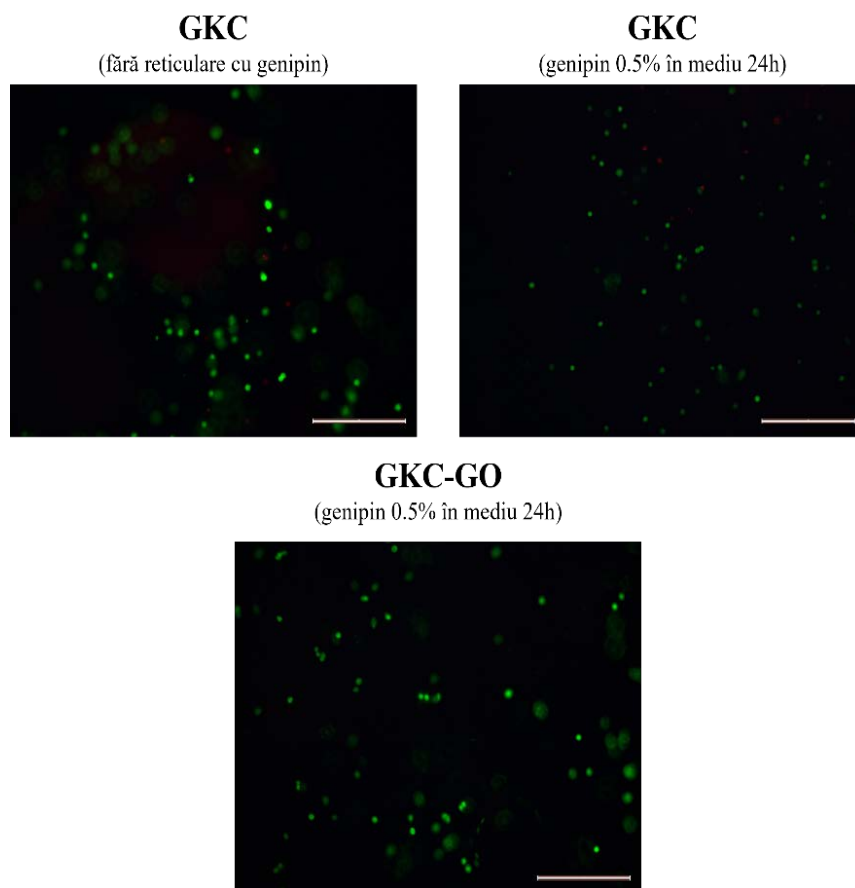


Figura 6. Imaginile de microscopie de fluorescență obținute la o zi prin marcarea Live/Dead a probelor pe bază de gelatină, K-caragenan, CNF-uri, COOH-GO și celule MG63 (verde - celule vii; roșu – celule moarte; scala de 200 μm).

III.1.1.3.3. Formularea printabilă pe bază de K-caragenan, alginat, spirulină și celule MG63

Cea de-a treia compoziție investigată, bazată pe K-caragenan, alginat și spirulină, a fost, de asemenea, investigată anterior pentru validarea printabilității acesteia. Rezultatele au indicat un comportament reologic adecvat bioprintării 3D, lucru care a fost validat prin studiul de tip brevet științific înregistrat cu numărul A/00577. Datorită modificărilor reologice observate anterior odată cu utilizarea mediului DMEM ca solvent în loc de apă ultrapură, s-a ales

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

utilizarea apei pentru acest experiment. Astfel, formulările KA și KA/sp-0.5 însămânțate cu celule au fost încărcate în cartușe (**Figura 7-A**) și montate în bioimprimanta 3D Cellink (**Figura 7-B**).

Ambele formulări au prezentat o fidelitate de printare ridicată, așa cum se poate observa în **Figura 7-C**. Cu toate acestea, adăugarea de spirulină în formularea printabilă pare să îmbunătățească printabilitatea, aceste probe prezentând o fidelitate la printare mai apropiată de modelul de referință. Toate probele au fost reticulate și incubate în mediu DMEM (**Figura 7-D**), în condițiile standard de temperatură și umiditate, însă probele control KA au indicat o degradare rapidă încă din prima zi de incubare. Testele anterioare au indicat o stabilitate scăzută pentru formulările pe bază de alginat de sodiu și K-caragenan, fără spirulină. Astfel, evaluarea biocompatibilității a putut fi realizată doar pentru probele KA/sp-0.5, care și-au menținut stabilitatea pe termen lung.

Evaluarea viabilității celulare prin testul calitativ Live/Dead s-a realizat la 4 zile, după ce mediul de cultură a fost schimbat la 2 zile pentru menținerea viabilității celulare. Marcarea fluorescentă a indicat o preponderență a celulelor moarte (roșu colorate) pentru toate probele KA/sp-0.5 testate (**Figura 8**). Având în vedere compoziția formulării, care include exclusiv polimeri biocompatibili și spirulină, recunoscută pentru proprietățile sale biologice active, este puțin probabil ca viabilitatea celulară redusă să fie atribuită unui efect citotoxic intrinsec al materialului. În schimb, acest rezultat poate fi asociat fie cu solicitările mecanice impuse celulelor în timpul procesului de bioprintare, fie cu utilizarea apei ultrapure ca mediu de solubilizare, în detrimentul unui mediu de cultură complet, precum DMEM, pentru menținerea funcțiilor celulare. În consecință, sunt necesare investigații suplimentare pentru optimizarea parametrilor de bioprintare și a condițiilor de formulare, în scopul obținerii unor structuri bioprintate care să asigure o viabilitate celulară ridicată pe termen mediu și lung post-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

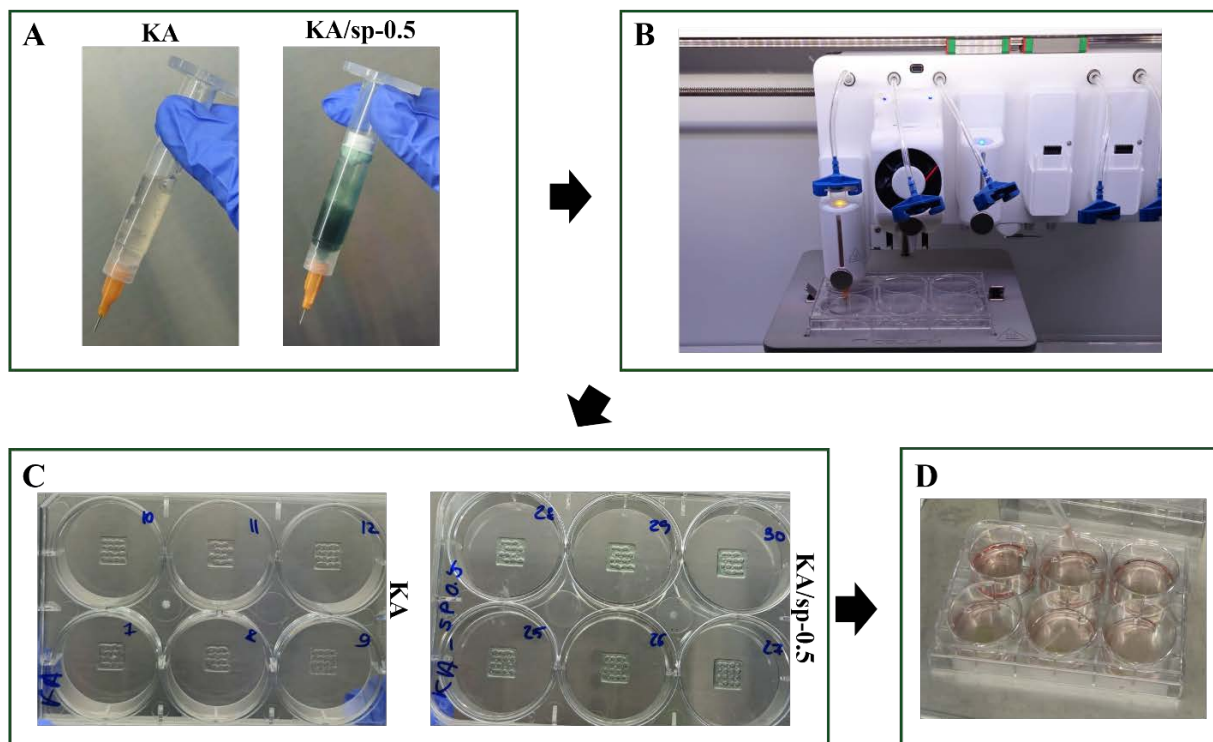


Figura 7. Bioprintarea formulărilor pe bază de K-caragenan, alginat, spirulina și celule MG63.

Cartușele conținând cele două formulări însăși amestecate cu celule (A). Montarea cartușului în bioimprimanta Cellink și bioprintarea 3D (B). Probele bioprintate cu cele două formulări (C). Incubarea structurilor bioprintate în mediul de cultură și condiții standard de umiditate și temperatură (D).

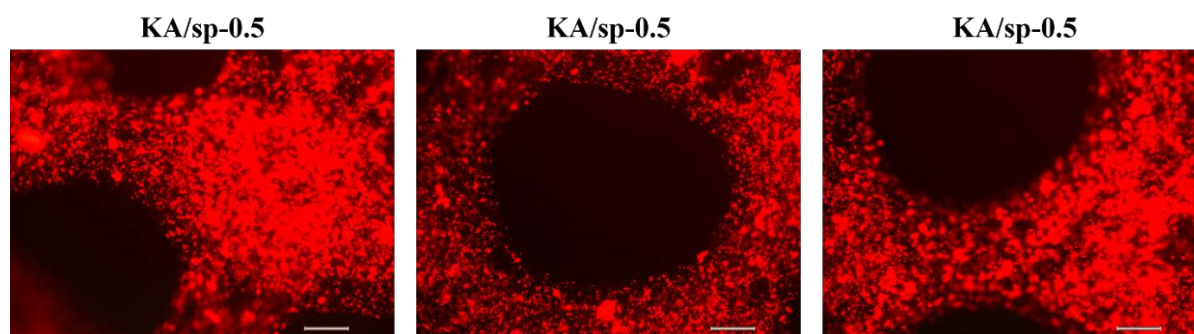


Figura 8. Imaginile de microscopie de fluorescență obținute la 4 zile prin marcarea Live/Dead a probelor pe bază de K-caragenan, alginat, spirulina și celule MG63 (verde - celule vii; roșu – celule moarte; scala de 200μm).

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

III.1.1.4. Concluzii

Prezentul studiu a avut ca obiectiv dezvoltarea, optimizarea și evaluarea unor formulări printabile destinate bioprintării 3D cu celule MG63, având în vedere atât proprietățile reologice și caracteristicile de fidelitate la printare, cât și menținerea stabilității și a viabilității celulare post-printare. Prin investigarea mai multor compoziții polimerice complexe, bazate pe combinații de gelatină, K-caragenan, gumă gelan, CNF-uri, COOH-GO și respectiv alginat, K-caragenan și spirulină, studiul evidențiază provocările asociate bioprintării cu celule vii și importanța echilibrului dintre proprietățile fizico-chimice ale materialelor și compatibilitatea biologică.

Rezultatele obținute pentru formulările care includ gumă gelan au demonstrat limitările acestui polimer în contextul bioprintării cu celule la 37°C. Deși gelanul este frecvent utilizat pentru îmbunătățirea comportamentului reologic și a stabilității structurale post-printare, în cazul de față, includerea sa a condus la o gelifiere rapidă și necontrolată în timpul bioprintării, favorizând formarea de aglomerate incompatibile cu extrudarea prin duze cu diametre mici, specifice bioprintării celulare. Aceste observații subliniază faptul că proprietățile reologice favorabile determinate în condiții ideale pot impune dificultăți în prezența celulelor și la temperaturi fiziologice, justificând excluderea gumei gelan din formulările ulterioare.

În contrast, formulările pe bază de gelatină, K-caragenan și CNF-uri, cu și fără adaos de COOH-GO, au demonstrat o compatibilitate inițială cu cerințele reologice ale bioprintării 3D, așa cum fusese validat anterior. Cu toate acestea, înlocuirea apei ultrapure cu mediu de cultură DMEM suplimentat, necesară pentru menținerea viabilității celulare, a introdus modificări semnificative ale comportamentului de printare. Compoziția complexă a mediului DMEM, a influențat interacțiunile intermoleculare dintre componentele polimerice, afectând fidelitatea de printare și evidențiind impactul mediului de solubilizare asupra performanței formulărilor printabile. Evaluarea viabilității celulare a evidențiat rezultate favorabile pentru compozițiile GKC și GKC-GO. Analiza Live/Dead efectuată la o zi post-bioprintare a indicat

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

o predominanță clară a celulelor viabile, fără diferențe semnificative între probele reticulate și cele nereticulate cu genipin. Aceste rezultate confirmă faptul că atât compoziția formulărilor, cât și parametrii de bioprintare selectați permit conservarea integrității și viabilității celulelor MG63. De asemenea, procesul de reticulare cu genipin în concentrație de 0,5% nu a indus efecte citotoxice detectabile, demonstrând compatibilitatea acestui agent de reticulare cu aplicațiile de bioprintare 3D.

În ceea ce privește formulările pe bază de gelatină, alginat și spirulină, studiul a evidențiat un rezultat diferit. Utilizarea apei ultrapure ca solvent a permis menținerea proprietăților reologice favorabile bioprintării, iar ambele formulări investigate au prezentat o fidelitate de printare ridicată. Adăosul de spirulină a contribuit suplimentar la îmbunătățirea stabilității și acurateței de printare. Cu toate acestea, stabilitatea pe termen lung a constructelor s-a dovedit a fi dependentă de compoziție, probele control KA degradându-se rapid în mediul de cultură, în timp ce probele conținând spirulină și-au menținut integritatea structurală. În mod surprinzător, evaluarea viabilității celulare la patru zile post-printare pentru formulările AK/sp-0.5 a evidențiat o predominanță a celulelor moarte, în ciuda utilizării unor componente biocompatibile și bioactive. Acest rezultat sugerează că viabilitatea celulară nu este determinată exclusiv de natura materialelor utilizate, ci este influențată de condițiile de procesare și de mediul inițial de solubilizare. Utilizarea apei ultrapure ca solvent, în absența nutrienților esențiali furnizați de mediul de cultură, precum și solicitările mecanice generate în timpul extrudării, pot contribui cumulativ la reducerea supraviețuirii celulare pe termen mediu.

În ansamblu, diferențele observate între formulările investigate subliniază importanța alegerii mediului de solubilizare, a temperaturii de procesare și a parametrilor de printare asupra performanței finale a constructelor bioprintate. De asemenea, studiul confirmă că strategii aparent benefice din punct de vedere mecanic sau structural pot deveni limitative atunci când sunt introduse cerințele biologice. Perspectivele viitoare ale acestei cercetări includ optimizarea suplimentară a formulărilor prin ajustarea compoziției polimerice și a

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

concentrațiilor, adaptarea parametrilor de bioprintare pentru reducerea stresului mecanic asupra celulelor și integrarea mediilor de cultură compatibile care să susțină viabilitatea celulară pe termen lung.

Bibliografie

- [1] X. Kang, X. B. Zhang, X. D. Gao, D. J. Hao, T. Li, and Z. W. Xu, “Bioprinting for bone tissue engineering,” Nov. 25, 2022, Frontiers Media S.A. doi: 10.3389/fbioe.2022.1036375.
- [2] N. Ashammakhi et al., “Bioinks and bioprinting technologies to make heterogeneous and biomimetic tissue constructs,” Jan. 01, 2019, Elsevier B.V. doi: 10.1016/j.mtbio.2019.100008.
- [3] H. W. Kang, S. J. Lee, I. K. Ko, C. Kengla, J. J. Yoo, and A. Atala, “A 3D bioprinting system to produce human-scale tissue constructs with structural integrity,” Nat Biotechnol, vol. 34, no. 3, pp. 312–319, Mar. 2016, doi: 10.1038/nbt.3413.
- [4] J. Groll et al., “A definition of bioinks and their distinction from biomaterial inks,” Jan. 01, 2019, Institute of Physics Publishing. doi: 10.1088/1758-5090/aaec52.
- [5] B. Shagdarova et al., “Collagen/chitosan gels cross-linked with genipin for wound healing in mice with induced diabetes,” Materials, vol. 15, no. 1, Jan. 2022, doi: 10.3390/ma15010015.
- [6] T. Distler, K. McDonald, S. Heid, E. Karakaya, R. Detsch, and A. R. Boccaccini, “Ionically and Enzymatically Dual Cross-Linked Oxidized Alginate Gelatin Hydrogels with Tunable Stiffness and Degradation Behavior for Tissue Engineering,” ACS Biomater Sci Eng, vol. 6, no. 7, pp. 3899–3914, Jul. 2020, doi: 10.1021/acsbomaterials.0c00677.
- [7] G. Reina, J. M. González-Domínguez, A. Criado, E. Vázquez, A. Bianco, and M. Prato, “Promises, facts and challenges for graphene in biomedical applications,” Aug. 07, 2017, Royal Society of Chemistry. doi: 10.1039/c7cs00363c.
- [8] Z. Li et al., “Graphene oxide-functionalized nanocomposites promote osteogenesis of human mesenchymal stem cells via enhancement of BMP-SMAD1/5 signaling pathway,” Biomaterials, vol. 277, Oct. 2021, doi: 10.1016/j.biomaterials.2021.121082.
- [9] Y. Wang, Z. Li, J. Wang, J. Li, and Y. Lin, “Graphene and graphene oxide: Biofunctionalization and applications in biotechnology,” May 2011. doi: 10.1016/j.tibtech.2011.01.008.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

III CAPITOLUL 2.

Sinteza gumei gellan metacrilate

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

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

III.1.2.1. Introducere

Hidrogelurile au atras un interes semnificativ în domeniul ingineriei tisulare datorită capacității lor de a mima mediul tridimensional al matricei extracelulare native, caracterizat printr-un conținut ridicat de apă, permeabilitate pentru nutrienți și posibilitatea de încapsulare celulară. Pentru a fi adecvate aplicațiilor biomedicale, aceste materiale trebuie să îndeplinească cerințe stricte privind biocompatibilitatea, stabilitatea în condiții fiziologice, proprietățile mecanice și rata de degradare, parametri care trebuie adaptați în funcție de tipul de țesut vizat [1, 2].

Guma gellan (GG) este un polizaharid anionic de origine microbiană, alcătuit din unități tetrasaharidice repetitive, care formează hidrogeluri prin mecanisme de reticulare fizică induse de temperatură și de prezența cationilor divalenți. Datorită biocompatibilității și utilizării sale deja aprobate în aplicații alimentare și farmaceutice, GG a fost propus ca material promițător pentru ingineria tisulară. Totuși, hidrogelurile de GG reticulate exclusiv ionic prezintă o stabilitate limitată în mediul fiziologic, unde cationii divalenți pot fi înlocuiți de cationi monovalenți, conducând la slăbirea rețelei polimerice și la pierderea integrității structurale *in vivo* [3, 4].

Pentru a depăși aceste limitări, o strategie frecvent utilizată constă în modificarea chimică a lanțurilor de gellan gum prin introducerea unor grupări reactive capabile de reticulare covalentă. Metacrilarea gellanului, realizată prin reacția grupărilor hidroxil cu anhidridă metacrilică, permite obținerea unui polimer fotosensibil care poate fi reticulat prin fotopolimerizare. Această abordare oferă un control superior asupra densității de reticulare,

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

proprietăților mecanice și comportamentului de umflare și degradare al hidrogelurilor rezultate, comparativ cu sistemele reticulate exclusiv fizic [5, 6].

Studiile raportate în literatură arată că gradul de metacrilare al gellanului influențează direct rigiditatea hidrogelurilor, capacitatea de absorbție a apei și rata de degradare enzimatică. Prin combinarea mecanismelor de reticulare fizică și chimică, se pot obține hidrogeluri cu proprietăți ajustabile într-un interval larg, adecvate pentru diferite aplicații de inginerie tisulară, de la țesuturi moi până la structuri cu cerințe mecanice mai ridicate. Mai mult, aceste hidrogeluri modificate chimic au demonstrat o bună compatibilitate celulară, susținând adeziunea, proliferarea și viabilitatea celulelor în condiții *in vitro* [7, 8]. În acest context, sinteza gellanului metacrilat reprezintă o etapă esențială pentru dezvoltarea unor platforme hidrogelice avansate, cu proprietăți controlabile, destinate aplicațiilor de bioprintare 3D și 4D în domeniul ingineriei tisulare osoase.

III.1.2.2. Materiale și metode

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

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

Materiale utilizate

Guma gellan comercială, anhidrida metacrilică (MA), membrane de dializă de 14 kDa și comprimatele cu soluție de tampon fosfat salin (PBS) au fost achiziționate de la Sigma-Aldrich. Apa distilată și soluția de NaOH au fost preparate în laboratorul nostru.

Sinteza gumei gellan metacrilate

Sinteza gellanului metacrilat (GGMA) a fost realizată în vederea obținerii unui polimer fotosensibil, adecvat pentru aplicații de inginerie tisulară. Procedura experimentală a avut ca punct de plecare guma gellan comercială, care a fost supusă unei reacții de metacrilare prin funcționalizarea grupărilor hidroxil cu anhidridă metacrilică, în condiții alcaline controlate.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

Protocolul a fost adaptat din literatura de specialitate [7, 8], cu ajustări privind cantitățile de reactivi, pentru a corespunde necesităților experimentale din laborator.

Inițial, 6 g de gellan gum comercial au fost dizolvate în 600 mL PBS, utilizând o baie de apă menținută la 90°C, timp de 2 ore, până la obținerea unei soluții omogene. Pe parcursul dizolvării, pH-ul soluției a fost monitorizat și ajustat în intervalul 8–8.5 prin adăugarea controlată a unei soluții de NaOH 5 M, pentru a asigura condiții favorabile reacției de metacrilare.

După omogenizare, s-au adăugat treptat, prin picurare, 24 mL de anhidridă metacrilică. Această etapă a fost însoțită de o tendință de scădere a pH-ului, motiv pentru care soluția a fost reajustată periodic cu NaOH 5 M, astfel încât pH-ul să fie menținut constant în intervalul 8–8.5. Reacția de metacrilare a fost lăsată să se desfășoare timp de 3 ore, sub agitație continuă, conducând la formarea derivatului metacrilat al gellanului, GGMA.

La finalizarea reacției, procesul de metacrilare a fost oprit prin adăugarea a 200 mL soluție PBS. Soluția obținută a fost supusă ulterior unui proces de purificare prin dializă, utilizând membrane de 14 kDa. Dializa (Figura 1) a fost realizată timp de 3 zile în apă distilată, cu înlocuirea mediului la fiecare 24 de ore, pentru eliminarea anhidridei metacrilice nereacționate, a sărurilor și a altor compuși reziduali.

După finalizarea dializei, soluția de GGMA a fost turnată în plăcuțe Petri și congelată, fiind ulterior pregătită pentru procesul de liofilizare. Materialul obținut sub formă solidă va fi utilizat în etapele experimentale ulterioare.

Dizolvarea gellanului comercial în soluție tampon fosfat salin la temperatură ridicată a condus la obținerea unei soluții omogene, fără agregate vizibile, indicând o hidratare completă a lanțurilor polimerice. Menținerea pH-ului în intervalul 8–8,5 s-a dovedit esențială pe întreaga durată a reacției, atât pentru favorizarea atacului nucleofil al grupărilor hidroxil asupra anhidridei metacrilice, cât și pentru prevenirea reacțiilor secundare nedorite.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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



Figura 1. Dializa soluției de gellan metacrilat utilizând membrane de 14 kDa în apă distilată

Adăugarea anhidridei metacrilice a determinat o scădere imediată a pH-ului, fenomen corectat prin ajustări succesive cu soluție de NaOH 5 M. Stabilitatea pH-ului pe durata reacției a permis desfășurarea eficientă a procesului de metacrilare, conducând la obținerea derivatului GGMA. Oprirea reacției prin diluare cu soluție PBS a asigurat neutralizarea mediului și limitarea reacțiilor ulterioare.

Procesul de purificare prin dializă, utilizând membrane cu limită de tăiere a masei moleculare de 14 kDa, a permis îndepărtarea eficientă a reactivului nereacționat și a produselor secundare cu masă moleculară mică. Schimbarea periodică a mediului de dializă a fost necesară pentru menținerea gradientului de concentrație și pentru creșterea eficienței purificării. După dializă, soluția de GGMA a prezentat un aspect clar, fără miros specific de anhidridă, sugerând o purificare adecvată.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

Congelarea și liofilizarea au condus la obținerea GGMA sub formă solidă, ușor manipulabilă și adecvată pentru depozitare și utilizare ulterioară. Confirmarea structurală a funcționalizării chimice poate fi realizată ulterior prin tehnici spectroscopice, precum FTIR sau RMN, prin evidențierea benzilor caracteristice grupărilor metacrilat.

III.1.2.3. Concluzii

Sinteza gellanului metacrilat a fost realizată cu succes prin metacrilarea gellanului comercial în mediu alcalin, utilizând anhidridă metacrilică ca agent de funcționalizare. Controlul strict al pH-ului și purificarea prin dializă au fost etape critice pentru obținerea unui produs final adecvat din punct de vedere chimic. GGMA obținut prezintă potențial pentru utilizare ca precursor de hidrogeluri fotoreticulabile, fiind compatibil cu aplicații ulterioare în ingineria tisulară și procesarea prin tehnici de fabricație aditivă.

Bibliografie

- [1] Cojocaru F-D, Balan V, Verestiuc L. Advanced 3D Magnetic Scaffolds for Tumor-Related Bone Defects. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022; 23(24):16190. <https://doi.org/10.3390/ijms232416190>
- [2] Lourenço D, Lopes R, Pestana C, Queirós AC, João C, Carneiro EA. Patient-Derived Multiple Myeloma 3D Models for Personalized Medicine—Are We There Yet? *International Journal of Molecular Sciences*. 2022; 23(21):12888. <https://doi.org/10.3390/ijms232112888>
- [3] F. J. Müller and O. S. Fenton, “Additive Manufacturing Approaches toward the Fabrication of Biomaterials,” *Adv. Mater. Interfaces*, vol. 9, no. 7, p. 2100670, Mar. 2022, doi: 10.1002/ADMI.202100670.
- [4] Laura E. Agibayeva, Dautlet B. Kaldybekov, Natalia N. Porfiryeva, Venera R. Garipova, Rauash A. Mangazbayeva, Rouslan I. Moustafine, Irina I. Semina, Grigoriy A. Mun,

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

Sarkyt E. Kudaibergenov, Vitaliy V. Khutoryanskiy, Gellan gum and its methacrylated derivatives as in situ gelling mucoadhesive formulations of pilocarpine: In vitro and in vivo studies, *International Journal of Pharmaceutics*, Volume 577, 2020, 119093, ISSN 0378-5173, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119093>.

- [5] D'Amora U, Ronca A, Scialla S, Soriente A, Manini P, Phua JW, Ottenheim C, Pezzella A, Calabrese G, Raucci MG, Ambrosio L. Bioactive Composite Methacrylated Gellan Gum for 3D-Printed Bone Tissue-Engineered Scaffolds. *Nanomaterials (Basel)*. 2023 Feb 19;13(4):772. doi: 10.3390/nano13040772.
- [6] Severini, L., Tavagnacco, L., Angelini, R. *et al.* Methacrylated gellan gum hydrogel: a smart tool to face complex problems in the cleaning of paper materials. *Cellulose* **30**, 10469–10485 (2023). <https://doi.org/10.1007/s10570-023-05479-z>
- [7] Z. Xu, Z. Li, S. Jiang, and K. M. Bratlie, “Chemically Modified Gellan Gum Hydrogels with Tunable Properties for Use as Tissue Engineering Scaffolds,” *ACS Omega*, vol. 3, no. 6, pp. 6998–7007, 2018, doi: 10.1021/acsomega.8b00683.
- [8] D. F. Coutinho *et al.*, “Modified Gellan Gum hydrogels with tunable physical and mechanical properties,” *Biomaterials*, vol. 31, no. 29, pp. 7494–7502, 2010, doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.06.035.

CONCLUZII GENERALE

Rezultatele obținute în cadrul raportului științific consolidat pentru perioada octombrie–decembrie 2025 evidențiază un progres consistent al proiectului REOSTEOMi, reflectat prin publicarea articolelor anexate, dezvoltarea de biomateriale avansate destinate regenerării osoase și integrarea rațională a acestora în fluxuri moderne de bioprintare 3D cu celule, precum și în etape de validare biologică *in vitro* și *in vivo*. Activitățile desfășurate confirmă faptul că abordarea multidisciplinară adoptată, care combină chimia polimerilor naturali, nanotehnologia, bioprintarea 3D/4D și evaluarea biologică *in vitro* și *in vivo*, permite

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

obținerea unor platforme funcționale cu relevanță clinică potențială pentru gestionarea complicațiilor osoase asociate mielomului multiplu.

În ceea ce privește dezvoltarea scaffoldurilor polimerice, rezultatele demonstrează în mod clar că performanța finală a materialelor este determinată de o corelare fină între compoziția formulărilor printabile, parametrii de procesare și strategiile de reticulare utilizate. Studiile sistematice efectuate asupra formulărilor pe bază de gelatină, κ -caragenan, nanofibre de celuloză și COOH-GO au arătat că variații aparent minore ale temperaturii de lucru sau ale concentrației agentului de reticulare pot conduce la modificări majore ale comportamentului reologic și, implicit, ale procesabilității. Fenomenele de gelificare prematură observate în seturile inițiale au evidențiat sensibilitatea sistemului la tranzițiile sol-gel ale κ -caragenanului și la cinetica reacțiilor de reticulare chimică induse de genipin. Optimizarea progresivă a protocolului a permis însă identificarea unei ferestre tehnologice stabile, materializată în setul 5, care a demonstrat o combinație favorabilă între omogenitate, stabilitate reologică și reproductibilitate.

Formulările optimizate reflectă o integrare funcțională a componentelor, fiecare având un rol bine definit în arhitectura finală a scaffoldului. Gelatina asigură un suport biocompatibil și biofuncțional, cu afinitate pentru adeziunea și proliferarea celulară, κ -caragenanul contribuie la stabilitatea structurală și la menținerea integrității în medii apoase, iar nanofibrele de celuloză consolidează rețeaua polimerică și limitează degradarea prematură. Introducerea oxidului de grafenă funcționalizat cu grupări carboxil a adus un dublu avantaj, atât prin îmbunătățirea proprietăților mecanice și a interacțiunilor interfaciale din matrice, cât și prin furnizarea unei platforme reactive pentru funcționalizare bioactivă ulterioară.

Strategiile de reticulare evaluate în cadrul acestei etape au evidențiat importanța alegerii corecte a mecanismului de stabilizare a rețelei polimerice. Comparativ cu reticularea ionică utilizând tripolifosfat de sodiu, reticularea cu ioni Ca^{2+} s-a dovedit net superioară, generând punți ionice mai stabile și o structură tridimensională mai bine organizată, adecvată implantării.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

Combinarea reticulării ionice cu reticularea chimică blândă prin genipin a permis obținerea unui echilibru între stabilitate pe termen lung și biocompatibilitate, evitând citotoxicitatea asociată agenților de reticulare convenționali. Etapele de înghețare și liofilizare au condus la obținerea unor structuri poroase bine definite, cu morfologie adecvată pentru difuzia nutrienților și oxigenului, condiție esențială pentru aplicațiile de inginerie tisulară osoasă.

Evaluările biologice preliminare in vitro au confirmat că scaffoldurile dezvoltate sunt compatibile cu mediul celular și capabile să susțină viabilitatea și proliferarea liniei celulare MG-63. Absența efectelor citotoxice semnificative, chiar și în prezența unor cantități reziduale de genipin, indică stabilitatea chimică a rețelei și eficiența etapelor de spălare. Creșterea densității celulare observată după trei zile de incubare sugerează că materialele nu se limitează la un rol pasiv de suport, ci contribuie activ la crearea unui microambient favorabil interacțiunilor celulare timpurii, aspect relevant pentru etapele ulterioare de osteogeneză.

Din perspectiva validării in vivo, această etapă marchează un pas important prin tranziția de la optimizarea materialelor la evaluarea comportamentului acestora într-un sistem biologic complex. Implantarea scaffoldurilor în modele murine, realizată conform standardelor etice și metodologice, creează premisele pentru obținerea unor informații esențiale privind toleranța locală și sistemică, integrarea tisulară și răspunsul inflamator. Funcționalizarea scaffoldurilor cu BMP-2 prin legare covalentă folosind chimia EDC/NHS reprezintă un element cheie al strategiei terapeutice, deoarece permite imobilizarea stabilă a unui factor osteoinductiv major, reducând riscul de difuzie necontrolată și maximizând eficiența locală. Această abordare deschide posibilitatea corelării directe între datele obținute in vitro și performanța biologică in vivo, într-un cadru experimental controlat.

Un aport semnificativ al acestei etape îl constituie dezvoltarea platformei digitale pentru predicția vâscozității, parametrilor de printare și a scorului de printabilitate pentru hidrogeluri. Integrarea datelor experimentale reologice cu modele matematice simplificate, dar coerente din punct de vedere fizic, a permis obținerea unui instrument capabil să reproducă tendințele reale

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

observate în laborator. Platforma facilitează selecția rațională a concentrațiilor, temperaturilor și parametrilor de extrudare, reducând necesitatea ciclurilor empirice extensive și accelerând procesul de dezvoltare a formulărilor printabile. Corelația consistentă dintre valorile experimentale și cele generate de platformă confirmă utilitatea acesteia ca instrument predictiv preliminar, cu potențial de extindere către alte sisteme polimerice și formulări bioactive.

Mai mult, în această etapă au fost investigate mai multe formulări polimerice naturale destinate bioprintării 3D și regenerării osoase, dezvoltate pentru a asigura un echilibru între procesabilitate, stabilitate structurală și compatibilitate biologică. Formulările pe bază de gelatină, κ -caragenan, gellan, nanofibre de celuloză și grafenă carboxilată au demonstrat un comportament reologic adecvat extrudării și integritate structurală post-printare, în timp ce variantele optimizate cu gelatină, κ -caragenan, nanofibre de celuloză și grafenă carboxilată au fost adaptate pentru evaluări biologice in vitro și in vivo. În paralel, a fost dezvoltată o formulare bioactivă pe bază de alginat, κ -caragenan și spirulină, în care spirulina a fost integrată ca agent bioactiv natural, susținând viabilitatea celulară și extinzând portofoliul de scaffolduri funcționale pentru aplicații de regenerare osoasă. A fost realizată de asemenea, sinteza gelanului metacrilat, în vederea extinderii gamei de materiale fotoreticulabile utilizabile în bioprintare. Funcționalizarea gellanului cu grupări metacrilat a permis introducerea unor situsuri reactive pentru reticulare fotoindusă, oferind un control sporit asupra proprietăților mecanice și stabilității structurale ale hidrogelurilor obținute. GGMA obținut prezintă potențial ca precursor pentru hidrogeluri fotoreticulabile, fiind compatibil cu aplicații în ingineria tisulară și cu procesarea prin tehnici de fabricație aditivă.

Activitățile de diseminare și protecție a proprietății intelectuale, inclusiv depunerea cererii de brevet și publicarea articolelor științifice, confirmă maturitatea și relevanța rezultatelor obținute. Integrarea spirulinei ca agent bioactiv într-o formulare printabilă extinde portofoliul de biomateriale funcționale.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE
POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

În ansamblu, rezultatele prezentate în acest raport confirmă că obiectivele etapei au fost atinse și că proiectul REOSTEOMi se află pe o traiectorie solidă către dezvoltarea unor substituenți osoși avansați, personalizabili și biofuncționali. Convergența dintre optimizarea materialelor, validarea biologică și instrumentele digitale de predicție oferă un cadru integrat pentru abordarea complexității regenerării osoase în contextul mielomului multiplu. Etapele următoare vor beneficia de baza experimentală și conceptuală construită în această perioadă, permițând aprofundarea studiilor in vivo, corelarea datelor structurale și biologice și avansarea către soluții cu potențial real de aplicare biomedicală.

Întocmit de membrii echipei de implementare,

Ing. Dobrișan Mihaela-Raluca

Dr. Ing. Chiticaru Elena Alina

Drd. Ing. Toader Georgian Alin

Dr. Ing. Ghighină Elena

Dr. Ghiță Alina-Ioana

Avizat de responsabilul de proiect,

Prof. Dr. Ing. Mariana IONIȚĂ

Data: 31.12.2025

Data: 31.12.2025