

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

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 ianuarie-martie 2026

Continuând direcțiile de cercetare dezvoltate în etapele anterioare ale proiectului, orientate spre obținerea și caracterizarea unor biomateriale inovatoare cu potențial aplicativ în regenerarea osoasă, etapa actuală urmărește aprofundarea acestor rezultate prin integrarea tehnologiilor de printare 3D cu celule și prin extinderea evaluării biologice a scaffoldurilor dezvoltate. Proiectul REOSTEOMi are ca obiectiv dezvoltarea unor soluții terapeutice avansate pentru gestionarea complicațiilor osoase asociate mielomului multiplu (MM), o afecțiune complexă a măduvei osoase care afectează sever structura și funcționalitatea țesutului osos, cu impact major asupra calității vieții pacienților. În acest context, proiectul urmărește dezvoltarea unor substituenți osoși care să ofere suport structural, stabilitate și un răspuns biologic favorabil, astfel încât să poată fi utilizate în strategii moderne de regenerare și reparare osoasă. Un obiectiv central al acestei etape îl reprezintă dezvoltarea unor scaffolduri cu arhitectură controlată, adaptate atât pentru evaluări *in vitro*, cât și pentru validări *in vivo*. Aceste structuri sunt concepute astfel încât să reproducă, într-o manieră cât mai apropiată, caracteristicile morfologice și funcționale relevante ale țesutului osos și să ofere un microambient favorabil pentru menținerea viabilității celulare, adeziunea și proliferarea celulelor. În același timp, arhitectura lor trebuie să permită difuzia eficientă a nutrienților și a oxigenului, aspect esențial atât pentru testările biologice *in vitro*, cât și pentru integrarea tisulară ulterioară în modelele experimentale *in vivo*. Din această perspectivă, evaluarea comportamentului celular în contact cu aceste materiale reprezintă un pas esențial pentru anticiparea performanței lor biologice ulterioare.

În cadrul Etapei 11 a proiectului, desfășurată în perioada ianuarie-martie 2026, activitățile de cercetare au fost orientate spre dezvoltarea și optimizarea unor formulări polimerice destinate obținerii de substituenți osoși cu celule pentru regenerare osoasă. Au fost

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

investigate scaffolduri și formulate bio-cerneluri destinate printării și bioprintării 3D, pe bază de alginat, κ -caragenan și spirulină, în diferite compoziții și concentrații, cu sau fără osteoblaste MC3T3-E1, acestea fiind ulterior printate și evaluate din punct de vedere al viabilității celulare prin teste de tip Live/Dead. În paralel, au fost inițiate și extinse culturile celulare pentru liniile RPMI 8226, hMSC-BM și MC3T3-E1, necesare pentru evaluarea biologică a materialelor dezvoltate și pentru etapele experimentale ulterioare. Totodată, a fost realizată sinteza gelatinei metacrilate (GelMA), în vederea obținerii unui precursor polimeric fotoreticulabil, adecvat dezvoltării de hidrogeluri pentru aplicații de inginerie tisulară. A fost realizată pregătirea culturilor celulare și evaluarea preliminară a biocompatibilității structurilor pe bază de GelMA, GellanMA și diferite concentrații de GO, prin teste de tip Live/Dead, pentru investigarea răspunsului celular în contact cu aceste sisteme. În aceeași etapă, au fost obținuți substituenți osoși destinați validării biologice *in vitro* și *in vivo*, în vederea evaluării potențialului lor pentru aplicații în regenerarea osoasă.

Prin rezultatele obținute, această etapă consolidează baza experimentală a proiectului și completează în mod direct direcțiile de cercetare deja dezvoltate în REOSTEOMi, oferind noi date privind relația dintre compoziția materialelor, comportamentul lor la printare și răspunsul biologic asociat. Prin urmare, activitățile de cercetare desfășurate în această etapă sunt integrate în mod strategic în etapele următoare ale planului de realizare al proiectului:

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

Subactivitatea 3.1. Validarea substituenților osoși în modele de șoarece.

- Sinteza de formulări printabile pe bază de alginat și K-caragenan (teste preliminare).
- Experimente de (bio)printare 3D cu celule osteoblaste MC3T3-E1 și formulări printabile pe bază de alginat și K-caragenan.
- Inițierea culturilor celulare pentru liniile RPMI 8226, hMSC-BM și MC3T3-E1.
- Pasaje celulare pentru liniile RPMI 8226, hMSC-BM și MC3T3-E1.
- Sinteza gelatinei metacrilate.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

- Pregătirea culturii celulare MG 63 pentru realizarea experimentelor de biocompatibilitate a structurilor din GelMA, GellanMA și diferite concentrații de GO, prin testare Live/Dead.

- Obținerea de substituenți osoși pentru validare *in vitro* și *in vivo* pentru reticulare cu ion beam (la puteri de 2 eV și 10 eV).

- Pregătirea și suplimentarea mediilor de cultură celulară cu ser fetal bovin, penicilină–streptomicină și factori de creștere, pentru inițierea liniilor celulare MC3T3-E1, hMSC-BM și RPMI 8226.

- Elaborarea capitolului ”Commonly used algorithms” pentru articolul review draft ”Advances in Artificial Intelligence for 3D Printing Tissue Regeneration: A State-of-the-Art Review”.

- Elaborarea articolului tip review-„Multiple Myeloma and Osteosarcoma through in silico lens, an era of adapting and learning systems” și înaintarea către publicare la revista International journal of molecular sciences cu factor de impact 4.9.

- Elaborarea capitolului ”Bioprinting for tissue engineering” pentru articolul review draft ”Advances in Artificial Intelligence for 3D Printing Tissue Regeneration: A State-of-the-Art Review”. Participarea la experimente de modificare a gelatinei cu grupări metacrilice (GelMA).

- Elaborarea și înaintarea abstractului cu titlul ”Recent Progress in AI-Driven 3D (Bio)Printing for Tissue Engineering” către AI4X - Accelerate Conference 2026.

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

- Sinteza de formulări printabile pe bază de alginat, K-caragenan și spirulină .

- Experimente de (bio)printare 3D cu celule osteoblaste MC3T3-E1 și formulări printabile pe bază de alginat, K-caragenan și spirulină.

-Elaborarea articolului de tip review intitulat: Photophysical and quenching principles governing fluorescence-based (nano)biosensors: materials, mechanisms, and analytical performance, și înaintarea spre publicare către jurnalul Light: Science& Application cu factor

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

de impact 23.1.

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

- Prelucrarea rezultatelor obținute în urma sintezei de scaffolduri din formulări printabile pe bază de alginat și K-caragenan adecvate pentru (bio)printare 3D cu celule osteoblaste MC3T3-E1.

- Prelucrarea rezultatelor obținute în urma experimentelor de bioprintare 3D utilizând formulări printabile pe bază de alginat, K-caragenan și spirulină cu celule osteoblaste MC3T3-E1.

- Redactarea lucrării științifice de tip brevet ce are la bază studiile, analizele, și experimentele pe bioprintare cu formulări printabile pe bază de alginat și K-caragenan adecvate pentru (bio)printare 3D cu celule osteoblaste MC3T3-E1.

- Studiu de literatura privind elaborarea articolului cu titlu "Advanced In Vitro Bone Tumor Microenvironment Models for Multiple Myeloma and Osteosarcoma: Cross-Diseased Frameworks and AI-Enabled Applications".

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

- Analiza scaffoldurilor obținute din formulări printabile pe bază de alginat și K-caragenan adecvate prin (bio)printare 3D cu celule osteoblaste MC3T3-E1.

- Analiza scaffoldurilor obținute în urma experimentelor de bioprintare 3D utilizând formulări printabile pe bază de alginat, K-caragenan și spirulină cu celule osteoblaste MC3T3-E1.

- Analiza structurilor din GelMA, GellanMA și diferite concentrații de GO, prin testare Live/Dead.

- Elaborarea cover letter-ului și a răspunsului către editor și recenzenti, care detaliază modificările și clarificările aduse manuscrisului „Nanostructural Modulation of GelMA/GellanMA 3D Printed Scaffolds by Graphene Oxide: Implications for Printability and Cellular Response”, în vederea publicării în jurnalul Materials Today Advances cu fact de impact 8.0.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE
POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

PARTEA I

I.1. CAPITOL 1

I.1. Sinteza de formulări printabile pe bază de alginat și K-caragenan adecvate pentru (bio)printare 3D cu celule osteoblaste MC3T3-E1

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

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

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

I.1.1. Introducere

Printarea 3D reprezintă o tehnologie de fabricație aditivă care permite realizarea de structuri tridimensionale complexe prin depunerea controlată strat cu strat a materialelor, pe baza unor modele digitale. O extensie importantă a acestei tehnologii este bioprintarea 3D, care implică utilizarea de bio-cerneluri ce conțin materiale biocompatibile și celule vii, cu scopul de a crea structuri biomimetice pentru aplicații în ingineria tisulară, medicina regenerativă și studiul *in vitro* al țesuturilor [1].

În contextul bioprintării, selecția materialelor joacă un rol esențial în asigurarea printabilității, stabilității structurale și compatibilității biologice. Alginatul de sodiu este un biopolimer natural derivat din alge brune, larg utilizat în bioprintare datorită biocompatibilității, gelifierii rapide prin mecanism ionic și procesabilității facile. Cu toate acestea, alginatul prezintă limitări legate de proprietățile mecanice și de lipsa motivelor de adeziune celulară [2]. K-caragenanul, un alt biopolimer natural extras din alge roșii, este

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

apreciat pentru capacitatea sa de a forma geluri stabile, pentru rigiditatea structurală și pentru proprietățile sale reologice favorabile proceselor de printare [3].

Combinarea alginatului de sodiu cu K-caragenanul reprezintă o strategie promițătoare pentru obținerea unor bio-cerneluri cu proprietăți îmbunătățite. Sinergia dintre cei doi polimeri permite ajustarea vâscozității, a comportamentului reologic și a stabilității mecanice a suporturilor printate, contribuind totodată la o mai bună fidelitate geometrică. În acest context, pregelifierea alginatului înainte de procesul de bioprintare este deosebit de importantă, deoarece permite creșterea vâscozității și obținerea unui comportament pseudoplastic adecvat, esențial pentru extrudarea controlată și menținerea formei structurilor depuse [4].

După procesul de bioprintare, stabilizarea finală a structurilor se realizează prin gelifiere ionică, cel mai frecvent utilizând clorura de calciu (CaCl_2). Ionii de calciu joacă un rol esențial în formarea legăturilor ionice între lanțurile de alginat, conducând la obținerea unei rețele tridimensionale stabile. Concentrația și timpul de expunere la soluția de CaCl_2 influențează direct proprietățile mecanice, porozitatea și stabilitatea hidrogelului, având un impact semnificativ asupra mediului celular încapsulat [5].

În ceea ce privește componenta biologică, linia celulară MC3T3-E1, derivată din osteoblaste precursorare, este frecvent utilizată ca model *in vitro* pentru studiul osteogenezei și al regenerării osoase. Integrarea celulelor MC3T3-E1 în formulări printabile pe bază de alginat și K-caragenan permite evaluarea compatibilității bio-cernelurilor și a potențialului acestora pentru aplicații în ingineria țesutului osos [6]. Astfel, dezvoltarea și caracterizarea unor bio-cerneluri adecvate pentru bioprintarea 3D a celulelor osteoblastice reprezintă un pas important în direcția obținerii unor suporturi biomimetice funcționale.

I.1.2. Materiale și sinteză

I.1.2.1. Materiale

Alginatul de sodiu (A), K-caragenanul (K) și clorura de calciu (CaCl_2) au fost achiziționate de la Sigma-Aldrich. Linia celulară MC3T3-E1 a fost achiziționată de la Cytion,

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

Cell Line Service (CLS; Eppelheim, Germany) și menținută prin pasaje succesive, așa cum s-a detaliat în rapoartele anterioare. Mediul de cultură Alpha-Minimum Essential Medium (α -MEM), serul fetal bovin (FBS), penicilina-streptomicina (P-S), colorantul Albastru Tripan, tripsina și pachetele pentru obținerea soluției saline cu fosfat (PBS) au fost furnizate de Thermo Scientific. 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.

1.1.2.2. Sinteza formulărilor printabile acelulare și procesul de printare 3D

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

Subactivitatea 3.1. Validarea substituenților osoși în modele de șoarece.

În scopul evaluării capacității de printare 3D, s-a optimizat compoziția formulării printabile acelulare, sintetizându-se mai multe amestecuri polimerice pe bază de alginat de sodiu și K-caragenan (AK), în care s-au variat fie concentrația de A, fie concentrația de K, fie cea de CaCl_2 din etapa de pregelifiere, fie raportul masic dintre cei doi polimeri, conform tabelului 1.

Tabelul 1. Codificarea probelor, concentrațiile soluțiilor utilizate și optimizarea parametrilor de printare

Cod formulare	Conc. A (%)	Conc. K (%)	Raportul masic dintre A și K	Conc. CaCl_2^* pregelifiere (%)	Lungime \times Lățime \times Înălțime (mm \times mm \times mm)	Presiune de extrudare (kPa)	Viteză de printare (mm s ⁻¹)
5A2K21-0.3	5.0	2.0	2/1	0.3	10 \times 10 \times 1	80 – 90	6 – 7
3A2K21-0.3	3.0	2.0	1/2	0.3		70 – 80	9 – 10
3A2K11-0.3	3.0	2.0	1/1	0.3		75	9
3A2K11-0.2	3.0	2.0	1/1	0.2		50 – 60	8 – 10
1.5A1.5K11	1.5	1.5	1/1	0.0		85 – 90	10 – 12
1.5A1.5K11-0.1	1.5	1.5	1/1	0.1		75 – 80	6

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

* raportat la volumul soluției

Metoda de obținere a formulărilor printabile acelulare detaliate în **tabelul 1** a presupus amestecarea celor două soluții de polimeri (care au fost solubilizați în volume de apă separate) în rapoarte bine stabilite. Solubilizarea separată a celor doi polimeri s-a realizat astfel: alginatul de sodiu (1.5 – 5.0%) a fost dizolvat într-o soluție apoasă cu concentrații mici de CaCl_2 (0.1 – 0.3%) sub agitare magnetică timp de o oră, pe o baie de apă încălzită la 60°C , în timp ce K-caragenanul s-a solubilizat în apă ultrapură cu agitare magnetică viguroasă timp de aproximativ o oră, pe o baie de apă încălzită la 80°C (**figura 1**).

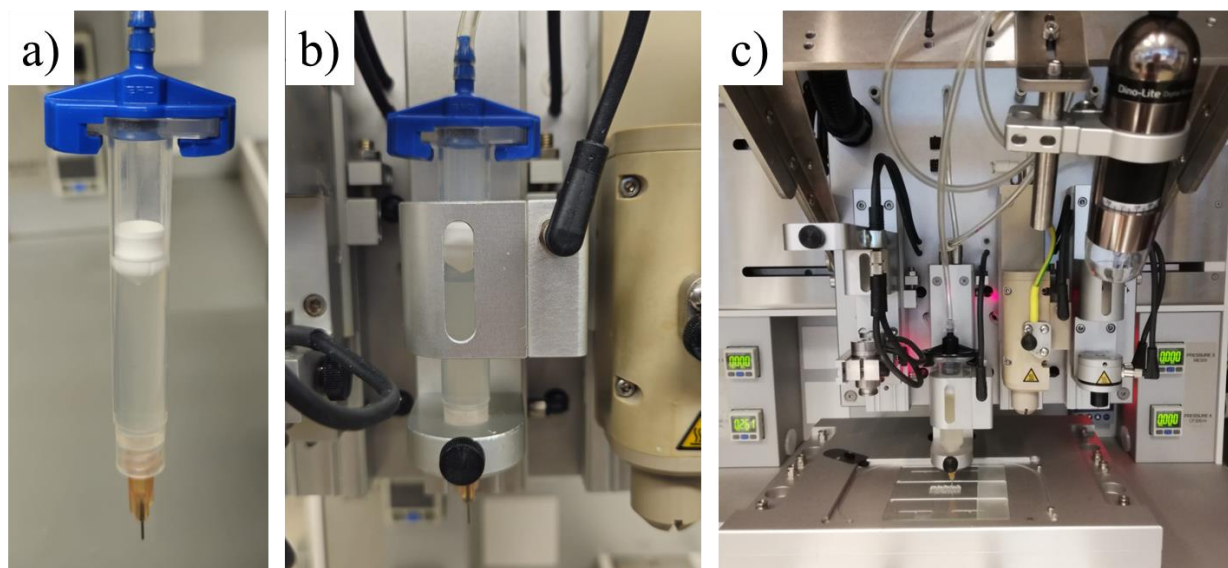


Figura 1. a) Cartușul de 3 mL prevăzut în partea superioară cu piston și în partea inferioară cu ac metalic de $330\ \mu\text{m}$, încărcat cu formularea printabilă 5A2K21-0.3; **b)** Cartușul prevăzut cu toate accesoriile montat la capătul de printare cu dispersare directă a bioimprimantei 3D Discovery; **c)** Procesul de printare 3D a suportului 5A2K21-0.3.

Formulările astfel obținute au fost turnate în cartușe de 3 mL prevăzute cu ac metalic cu diametru interior de $330\ \mu\text{m}$ și menținute în frigider, la temperatura de 3°C timp de 30

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

minute, ulterior putând fi utilizate în procesul de printare 3D, după ce parametrii de printare au fost în prealabil atent optimizați (**tabelul 1**). Procesul de printare 3D s-a realizat prin depunerea materialului în manieră strat cu strat pe o lamă de sticlă, sub acțiunea presiunii pneumatice, utilizând echipamentul de printare 3D Discovery (RegenHU, Villaz-St-Pierre) și software-ul BioCAD care a generat protocolul de printare sub forma codului G. Probele printate 3D au fost supuse unei gelifieri ionice prin imersarea acestora într-o soluție apoasă de 2% CaCl₂, unde au fost menținute timp de 10 minute. Ulterior, probele au fost spălate cu apă ultrapură pentru a îndepărta ionii de Ca²⁺ nereacționați, putând fi utilizate în analizele următoare.

I.1.2.3. Sinteza formulărilor printabile celulare

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

Subactivitatea 3.1. Validarea substituenților osoși în modele de șoarece.

În scopul evaluării capacității de bioprintare în prezența celulelor osteoblaste MC3T3-E1, s-au sintetizat două formulări polimerice pe bază de alginat de sodiu și K-caragenan în care s-a variat raportul masic dintre cei doi polimeri. 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 a presupus solubilizarea separată a K-caragenanului și a alginatului în soluție apoasă cu 0.3% CaCl₂, timp de o oră (**figura 2 a**); 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, apoi soluțiile astfel obținute s-au amestecat în rapoarte bine stabilite pentru a obține formulările 5A2K21-0.3 și 5A2K12-0.3 (**figura 2 b**). Codificările și concentrațiile utilizate sunt prezentate în **tabelul 2**. Probele printate au fost supuse unei gelifieri ionice prin imersare într-o soluție de 2% CaCl₂, unde s-au menținut timp de 10 minute.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

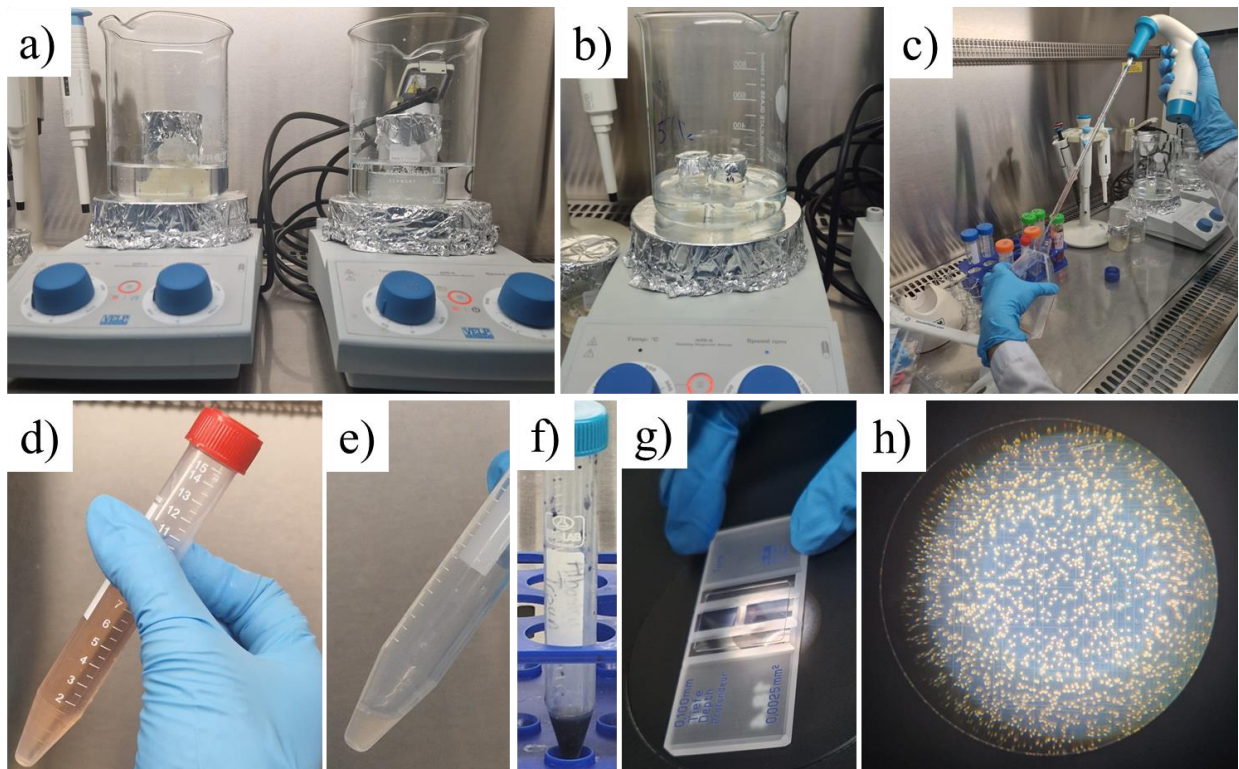


Figura 2. a) Solubilizarea alginatului, respectiv a K-caragenanului pe băi de apă încălzite; b) Sinteza formulărilor pe bază de alginat și K-caragenan omogenizate în rapoarte masice diferite pentru printarea 3D; c) Înlăturarea mediului de cultură vechi pentru desprinderea celulelor; d) Transferarea suspensiilor celulare în tub de centrifugă pentru sedimentarea celulelor; e) Celulele MC3T3-E1 înainte de însămânțarea în formularea printabilă; f) Tubul cu conținut de colorant Albastru Tripan folosit pentru numărarea celulelor; g) Cameră de numărare Neubauer pentru determinarea numărului de celule; h) Imagine optică cu celulele MC3T3-E1 în camera de numărare.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

Tabelul 2. Parametrii de bioprintare 3D a formulărilor celulare.

Cod formulare	Conc. Alginat (A) (%)	Conc. K-caragenan (K) (%)	Raportul masic dintre A și K	Conc. CaCl ₂ * (%)	Lungime × Lățime × Înălțime (mm × mm × mm)	Temperatura (°C)	Presiune de extrudare (kPa)	Viteză de printare (mm s ⁻¹)
5A2K21	5	2	2/1	0.3	10 × 10 × 1	25	50 – 80	10 – 12
5A2K21	5	2	2/1	0.3		55, apoi 4	75 - 80	7 – 10
5A2K12	5	2	1/2	0.3		4	75 – 85	6 – 8

* raportat la volumul soluției

I.1.2.4. Pregătirea suspensiei celulare și însămânțare în formulările printabile

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

Subactivitatea 3.1. Validarea substituenților osoși în modele de șoarece.

Pentru fiecare compoziție destinată bioprintării s-a utilizat o cultură celulară MC3T3-E1 cultivată într-un flacon de 75 cm² până la atingerea unei confluențe avansate (90–95%). Pentru pregătirea suspensiei celulare s-a înlăturat mediul de cultură din fiecare recipient (**figura 2 c**) 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 (**figura 2 d**). Centrifugarea s-a realizat la 1300 rpm timp de 3 minute, urmată de eliminarea supernatantului și adăugarea a 200 μL mediu suplimentat. Determinarea numărului de celule conținut s-a realizat prin adăugarea într-un tub Eppendorf a 10 μl suspensie celulară alături de 10 μl colorant Albastru Tripian, din care s-au adăugat câteva picături în hemocitometru (camera de numărare a celulelor) și numărarea celulelor (**figura 2 f, g, h**). S-a ales însămânțarea unei densități celulare de 8×10^6 celule/formulare. Incorporarea celor 200 μL mediu cu conținut de celule în

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

formulările printabile (**figura 2 e**) 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 steril de 3 mL, prevăzut cu un ac metalic steril, protejat de un vârf de micropipetă pentru a reduce riscul contaminării.

I.1.2.5. Bioprintarea 3D în condiții aseptice

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

Subactivitatea 3.1. Validarea substituenților osoși în modele de șoarece.

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 (**figura 3**), înaintea testării fiecărei formulări printabile, pentru a garanta sterilizarea procesului. Bioprintarea 3D s-a realizat direct în plăci cu godeuri sterile, la temperatura de 25°C, respectiv 4°C, pentru care s-au selectat ace sterile cu un diametru interior de 330 μm. Modelul ales a corespuns unui pătrat cu dimensiunile de 10 × 10 × 1 mm (3 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 2**. Pentru reticularea structurilor bioprintate, s-a ales o strategie de gelifiere ionică, utilizând ioni de Ca²⁺. Astfel, structurile bioprintate au fost transferate în hota cu flux laminar vertical, unde au fost inițial imersate în soluția de 2% CaCl₂ timp de 10 minute și apoi în α-MEM suplimentat cu o concentrație de 10 mM CaCl₂, unde au fost lăsate la incubat în condiții standard pentru 24 de ore.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

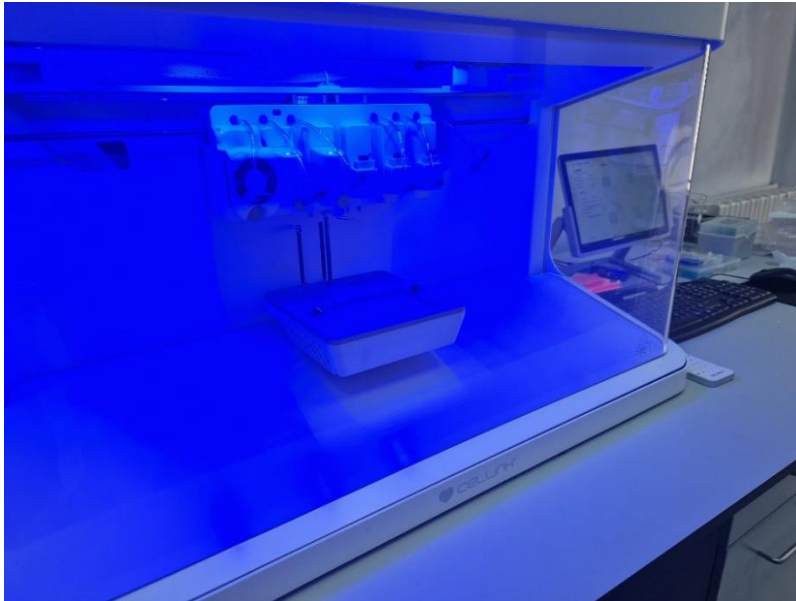


Figura 3. Sterilizarea bioimprimantei 3D BIO X6 înainte de bioprintarea formulărilor.

I.1.2.6. Analiză a viabilității celulare prin Live/Dead

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

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

Viabilitatea celulară a fost evaluată după 1, 2, 3 și 7 zile de incubare a probelor bioprintate în α -MEM suplimentat cu 10 mM CaCl_2 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 în condiții de întuneric, 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 suplimentat cu 5 mM CaCl_2 în fiecare godeu, pentru

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

a permite vizualizarea probelor marcate cu ajutorul microscopului cu fluorescență DMIL LED Fluo cu sistem DFC450-C (Leica, Germany).

I.1.3. Rezultate și discuții

I.1.3.1. Optimizarea sistemului și a timpului de gelifiere ionică

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

Subactivitatea 3.1. Validarea substituenților osoși în modele de șoarece.

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

Gelifierea ionică a suporturilor printate 3D cu formularea 5A2K21-0.3 a fost evaluată utilizând soluții apoase de CaCl₂ cu concentrații cuprinse între 2 – 4% pentru timpi de expunere între 10 – 30 minute (**tabelul 3**). Analiza comparativă a proprietăților structurale obținute a indicat rezultate similare între condițiile testate, fără diferențe semnificative în stabilitatea și integritatea suporturilor.

Tabelul 3. Condițiile de gelifiere ionică cu Ca²⁺ a suporturilor printate 3D.

Concentrația de CaCl ₂ / Timpul de expunere	10 minute	20 minute	30 minute
CaCl ₂ 2% (m/v)	✓	✓	✓
CaCl ₂ 3% (m/v)	✓	✓	✓
CaCl ₂ 4% (m/v)	✓	✓	✓

Având în vedere aceste observații, a fost selectată condiția de CaCl₂ 2% pentru 10 minute, reprezentând cea mai blândă combinație dintre cele evaluate, suficientă pentru obținerea gelifierii ionice dorite. Această alegere a fost realizată în acord cu principiul reducerii expunerii la concentrații ionice ridicate și timpi prelungiți, în special în contextul studiilor

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

ulterioare care implică înglobarea de celule osteoblaste, unde concentrații crescute de Ca^{2+} sau timpi de expunere mai mari pot afecta negativ viabilitatea celulară și funcționalitatea biologică a materialului printat.

I.1.3.2. Analiza stabilității *in vitro* în diferite medii a suporturilor aceluare printate 3D

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

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

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

Stabilitatea *in vitro* a suporturilor printate 3D aceluare provenite din formularea codificată 5A2K21-0.3, a fost evaluată în condiții care imită mediul fiziologic, utilizând o soluție de PBS cu pH 7.4, la 37°C (**figura 4**). Imediat după imersarea probelor în acest mediu, s-a observat o pierdere rapidă a integrității structurale, manifestată prin dezintegrarea structurilor încă din primele 5 minute de incubare. Acest comportament poate fi atribuit fenomenului de schimb ionic dintre ionii Ca^{2+} implicați în gelifierea alginatului și ionii monovalenți (Na^+) prezenți în PBS.

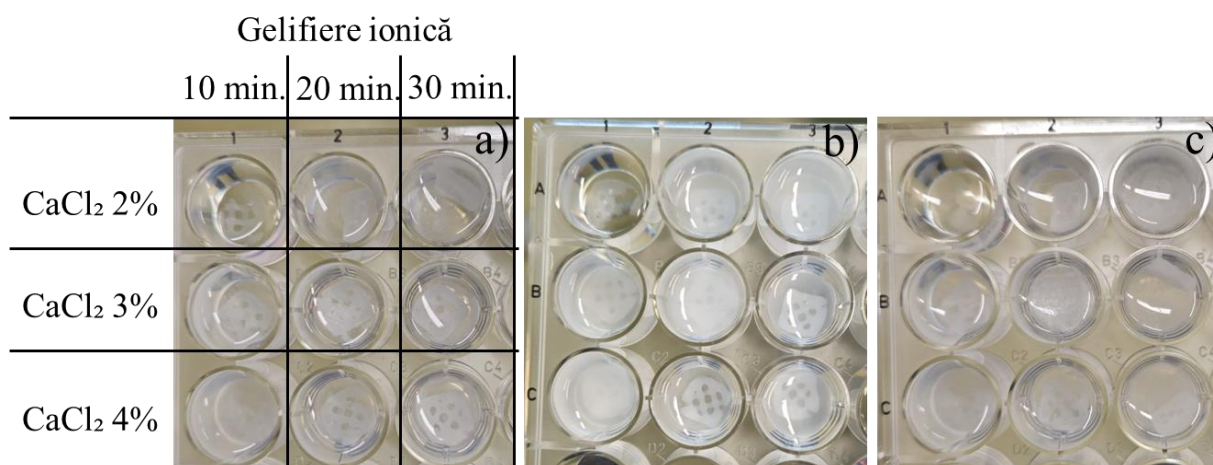


Figura 4. Evaluarea stabilității suporturilor aceluare printate 3D codificate 5A2K21-0.3 în PBS pH 7.4 la 37°C, după **a)** 5 minute, **b)** 15 minute, **c)** 30 minute.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

Pentru a permite evaluarea stabilității pe termen mai lung, mediul de incubare a fost schimbat cu o soluție Tris 10 mM, în care suporturile printate și-au menținut integritatea structurală și stabilitatea pe întreaga durată a experimentului de 7 zile. De asemenea, stabilitatea probelor a fost analizată și în mediul de cultură α -MEM; totuși, prezența ionilor de Na^+ în acest sistem a condus la un comportament similar celui observat în cazul PBS-ului, datorat aceluiași mecanism de schimb ionic, rezultând compromiterea stabilității structurilor printate.

În vederea reducerii fenomenului de schimb ionic, mediul de cultură α -MEM a fost suplimentat cu CaCl_2 în concentrații de 2 mM și 4 mM, însă acestea nu au fost suficiente pentru a preveni degradarea structurilor printate. În schimb, utilizarea unui mediu α -MEM completat cu 10 mM CaCl_2 a condus la menținerea integrității și a stabilității structurale a probelor printate pe parcursul mai multor zile de incubare.

I.1.3.3. Evaluarea printabilității formulărilor polimerice acelulare

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

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

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

Printabilitatea formulărilor polimerice pe bază de alginat și K-caragenan cu concentrații diferite de alginat, K-caragenan și CaCl_2 în etapa de pregelifiere, dar și cu rapoarte masice variate între cei doi polimeri, a fost evaluată din punct de vedere calitativ, analizând morfologia filamentului depus, luând în considerare atât omogenitatea și uniformitatea diametrului filamentului, cât și continuitatea extrudării și capacitatea de menținere a fidelității geometrice după depunerea materialului pe lame de sticlă atât într-un singur strat, cât și în 5 straturi (**figura 5**).

Dintre toate formulările printabile testate, formularea 5A2K21-0.3 a prezentat cea mai bună printabilitate și a fost considerată optimă din punct de vedere al menținerii fidelității formei după printare, odată cu creșterea în înălțime a suportului printat (creșterea numărului 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

straturi), fiind caracterizată prin omogenitatea, continuitatea și uniformitatea filamentului după depunerea acestuia pe suportul de sticlă. Această formulare a permis un echilibru optim între proprietățile reologice necesare extrudării și stabilitatea structurală necesară păstrării formei printate. Performanța superioară a formulării 5A2K21-0.3 poate fi atribuită unui raport optim între concentrația de alginat și concentrația de CaCl_2 utilizată în etapa de pregelifiere, care a condus la formarea unei rețele polimerice parțial reticulate, suficient de stabilă pentru menținerea formei, dar suficient de fluidă pentru a permite extrudarea continuă.

În schimb, formulările cu concentrații mai mici de alginat și de CaCl_2 (3A2K11-0.3, 3A2K21-0.3, 3A2K11-0.2, 1.5A1.5K11, 1.5A1.5K11-0.1) au prezentat o printabilitate redusă, manifestată prin filamente discontinue, neomogene și neuniforme. Acest comportament se poate explica printr-o gelifiere necontrolată și neuniformă, determinată de difuzia rapidă și localizată a ionilor Ca^{2+} în matricea polimerică. La concentrații reduse de alginat, densitatea lanțurilor polimerice este insuficientă pentru formarea unei rețele tridimensionale continue, ceea ce conduce la zone cu gelifiere excesivă locală și zone slab gelifiate. Acest dezechilibru determină apariția unor agregate pregelifiate, care afectează fluxul materialului prin acul de printare și duc la extrudare discontinuă și neuniformă. Așadar, rezultatele indică faptul că printabilitatea este guvernată nu doar de prezența agenților de gelifiere, ci și de controlul cineticii de gelifiere. Formularea 5A2K21-0.3 asigură un compromis optim între stabilitate și extrudabilitate, în timp ce formulările cu concentrații mai mici suferă de gelifere neuniformă și proprietăți reologice neadecvate procesului de printare.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

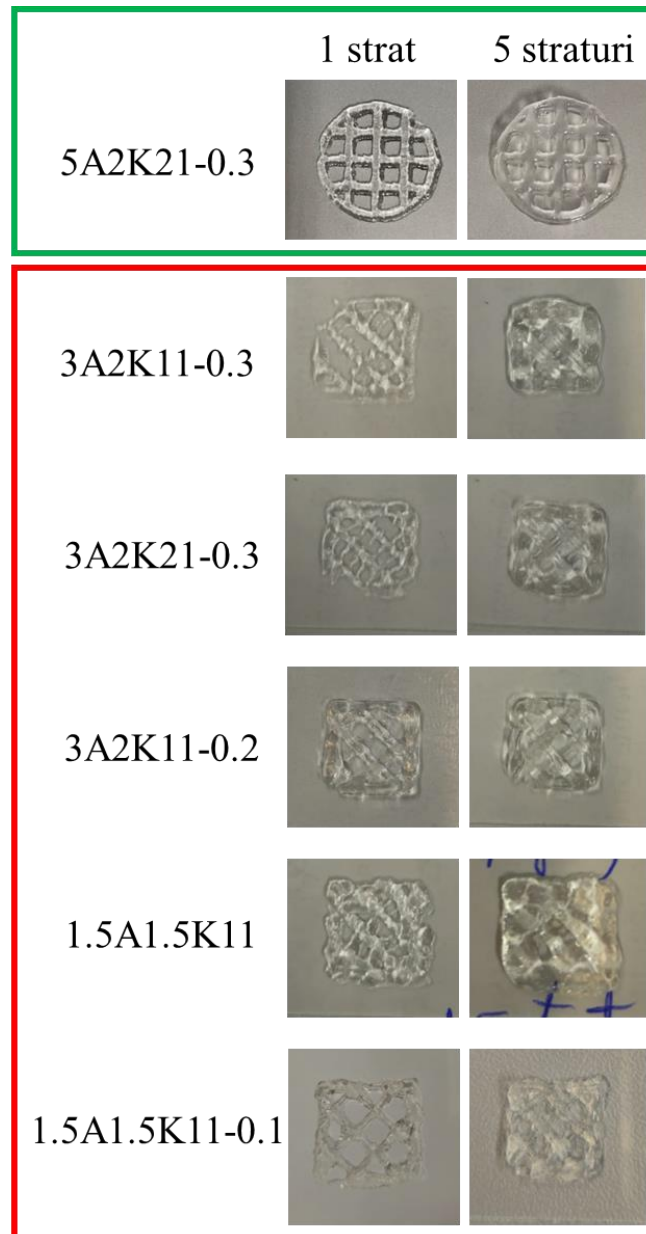


Figura 5. Evaluarea calitativă a printabilității formulărilor polimerice aceluare depuse pe suporturi de sticlă în 1 și 5 straturi.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

I.1.3.4. Bioprintarea formulărilor pe bază de alginat, K-caragenan și celule MC3T3-E1

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

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

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

Compozițiile pe bază de alginat și K-caragenan în diverse rapoarte masice au fost testate anterior pentru validarea proprietăților reologice și a fidelității formei la printare. Rezultatele obținute au validat compatibilitatea pentru utilizarea acestora în aplicații de bioprintare 3D. Ambele formulări, 5A2K21 și 5A2K12, au fost încărcate în cartușe de printare după adăugarea celulelor în compoziție. În **figura 6 a)** se pot observa cele două cartușe conținând formulările printabile cu celule, care au fost montate pe rând în bioimprimanta 3D BIO X6 (**figura 6 b)**).

În cazul formulării 5A2K21, în timpul procesului de bioprintare la temperatura de 25°C, viteza a variat între 10 – 12 mm s⁻¹, iar presiunea de extrudare a fost oscilată între 50 – 80 kPa, pentru determinarea parametrilor optimi. Cu toate acestea, s-au înregistrat dificultăți în obținerea unei fidelități de printare, așa cum se poate observa în **figura 6 c)**, cel mai probabil din cauza fluidității crescute a materialului induse de temperatura de printare de 25°C, care determină colapsarea straturilor printate.

În continuare, se observă că printarea aceleiași formulări, 5A2K21, dar răcită la 4°C, a condus la o printabilitate și fidelitate geometrică superioare comparativ cu 25°C. Acest comportament este atribuit gelifierii termice parțiale a K-caragenanului la temperaturi scăzute, care determină o creștere a vâscozității și a modulului elastic al materialului imediat după extrudare, ceea ce a impus utilizarea unor presiuni mai ridicate (75 – 80 kPa) și viteze de printare mai scăzute (7 – 10 mm s⁻¹). Stabilizarea rapidă a filamentului reduce colapsul structural și fuziunea între straturi, ducând la o reproducere mai precisă a geometriei structurilor printate. Deși temperaturile scăzute pot induce stres celular pe termen lung, în cazul de față expunerea a fost limitată la etapa de printare, permițând obținerea unui compromis favorabil între printabilitate și viabilitate celulară.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

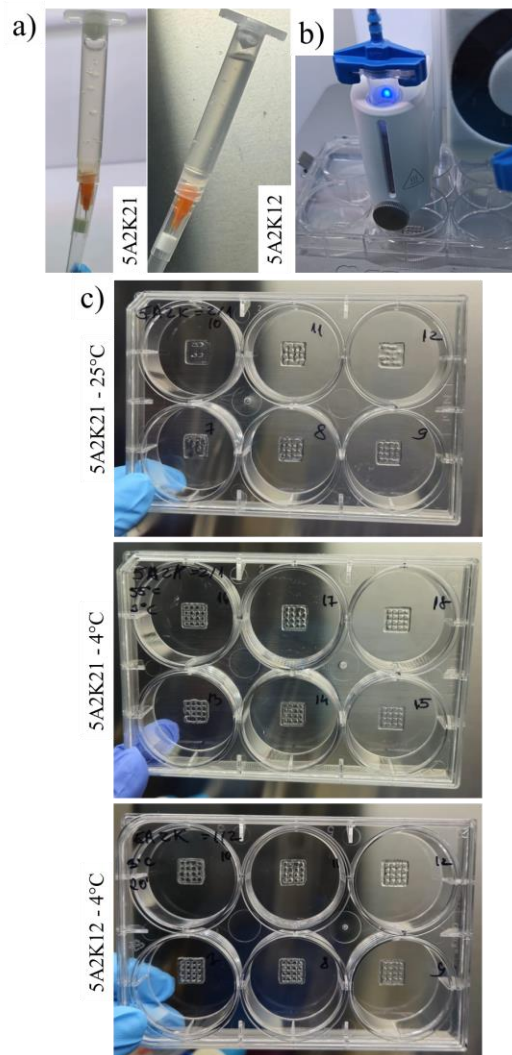


Figura 6. Bioprintarea formulărilor pe bază de alginat, K-caragenan și celule MC3T3-E1. **a)** Cartușele conținând cele două formulări însămânțate cu celule; **b)** Procesul de bioprintare a formulării în placă cu godeuri sterile; **c)** Probele bioprintate cu cele două formulări variind temperatura cartușului.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

Pentru formularea 5A2K12, cu o proporție crescută de K-caragenan, bioprintată la 4°C, au fost necesare presiuni de extrudare ușor mai ridicate (75 – 85 kPa) și viteze de printare mai reduse (6 – 8 mm s⁻¹). Explicația constă în faptul că K-caragenanul formează rapid structuri helix-helix, iar creșterea fracției sale amplifică gelifierea termică parțială deja prezentă în sistem. Astfel, materialul prezintă o recuperare structurală foarte rapidă după extrudare, favorabilă fidelității geometrice, dar care necesită parametri de printare mai conservatori pentru a evita discontinuități ale filamentului.

I.1.3.5. Analiza calitativă a viabilității celulare utilizând testul Live/Dead

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

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

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

Evaluarea viabilității celulare a celor 2 seturi de formulări prin testul calitativ Live/Dead s-a realizat la 1, 2, 3 și 7 zile de incubare după bioprintare, după ce mediul de cultură a fost schimbat la 2 zile pentru menținerea viabilității celulare. Imaginile optice obținute sunt prezentate în **Figura 7**.

Analiza viabilității celulare a evidențiat diferențe semnificative între formularea 5A2K21 bioprintată la 25°C și apoi la 4°C. Pentru probele bioprintate la 25°C, analiza imaginilor optice obținute indică o viabilitate celulară relativ echilibrată în primele 2 zile. Totuși, la intervale de timp mai îndelungate (zilele 3 și 7), se evidențiază o creștere progresivă a proporției de celule moarte, evidențiate prin colorație roșie, în detrimentul celor viabile colorate în verde, concomitent cu o reducere a populației de celule vii. Având în vedere compoziția formulării, care include exclusiv polimeri biocompatibili, este puțin probabil ca viabilitatea celulară redusă să fie atribuită unui efect citotoxic intrinsec al materialului. În schimb, acest rezultat poate fi asociat cu utilizarea apei ultrapure ca mediu de solubilizare, în

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

detrimentul unui mediu de cultură complet, precum α -MEM, pentru menținerea funcțiilor celulare.

În schimb, în cazul bioprintării formulării 5A2K21 la 4°C, scăderea drastică a viabilității celulare observată încă din prima zi de incubare poate fi corelată cu expunerea tranzitorie și neintenționată la temperaturi de 55°C, survenită ca urmare a unei creșteri termice necontrolate a echipamentului de bioprintare, care a inclus și cartușul ce conținea celulele. Această variație de temperatură a reprezentat un factor experimental neplanificat, care a condus la stres termic celular, cunoscut pentru impactul negativ asupra integrității și funcționalității celulare. Testul Live/Dead nu s-a putut efectua decât la o zi după bioprintare, deoarece marcarea fluorescentă a indicat o preponderență a celulelor neviabile pentru proba 5A2K21 – 4°C, încă din prima zi de incubare.

Imaginile optice obținute prin marcarea Live/Dead a probei bioprintate 5A2K12 la 4°C indică o predominanță clară a celulelor viabile, în timp ce un număr extrem de redus de celule neviabile, a fost observat în probele analizate. Aceste rezultate sugerează că atât compoziția, cât și parametrii selectați pentru procesul de bioprintare, inclusiv temperatura de 4°C, permit menținerea unei viabilități celulare ridicate în primele 2 zile de incubare. Totuși, se observă o scădere progresivă a viabilității celulare începând cu ziua 3, care poate fi asociată cu densitatea crescută și rigiditatea matricei, ce pot limita difuzia nutrienților și a oxigenului și pot induce stres mecanic asupra celulelor osteoblaste MC3T3-E1. În plus, caracterul bioinert al hidrogelului, lipsit de motive de adeziune celulară, precum și absența degradării și remodelării matricei pot contribui la diminuarea progresivă a supraviețuirii celulare pe termen mediu.

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

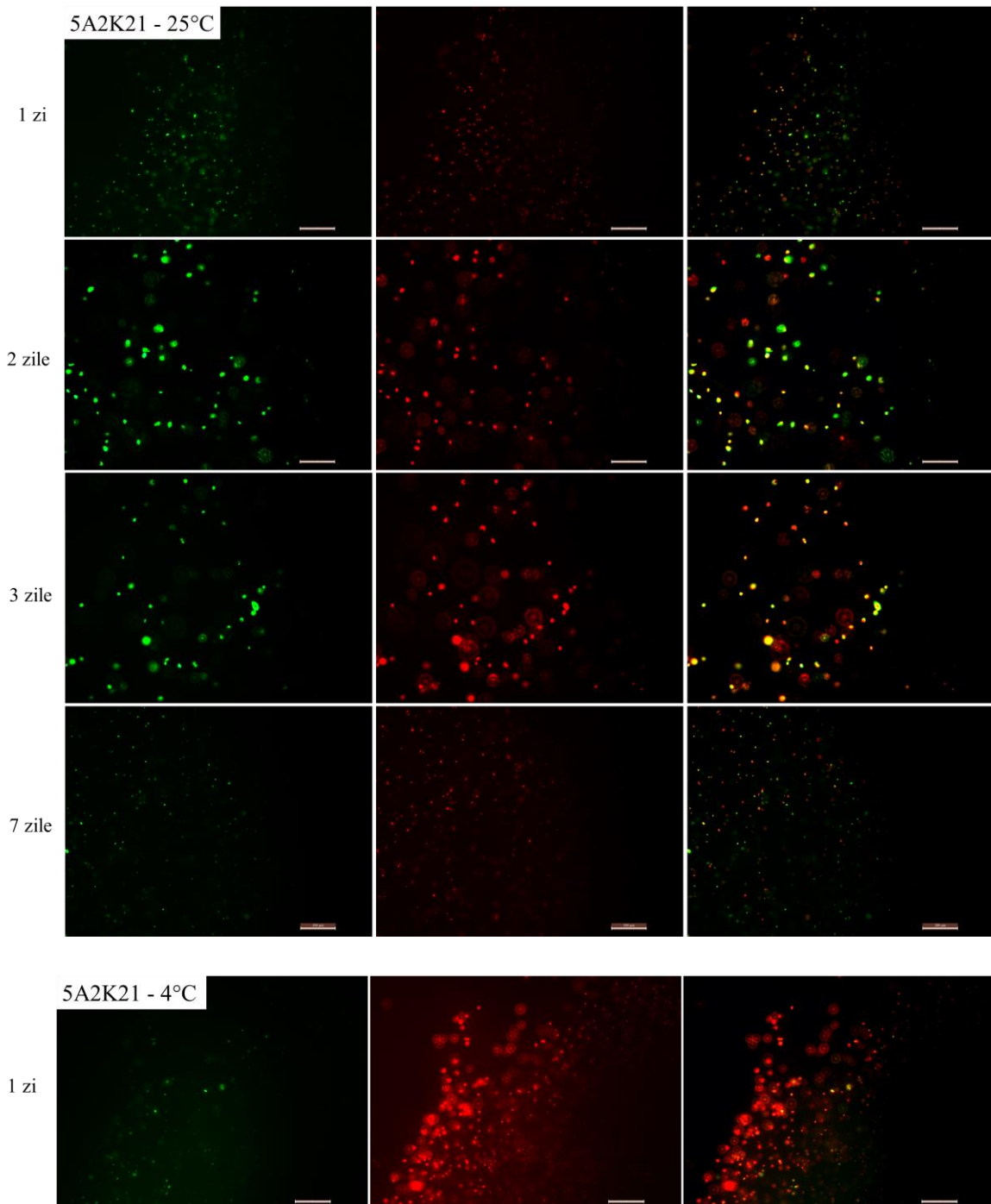
Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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



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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

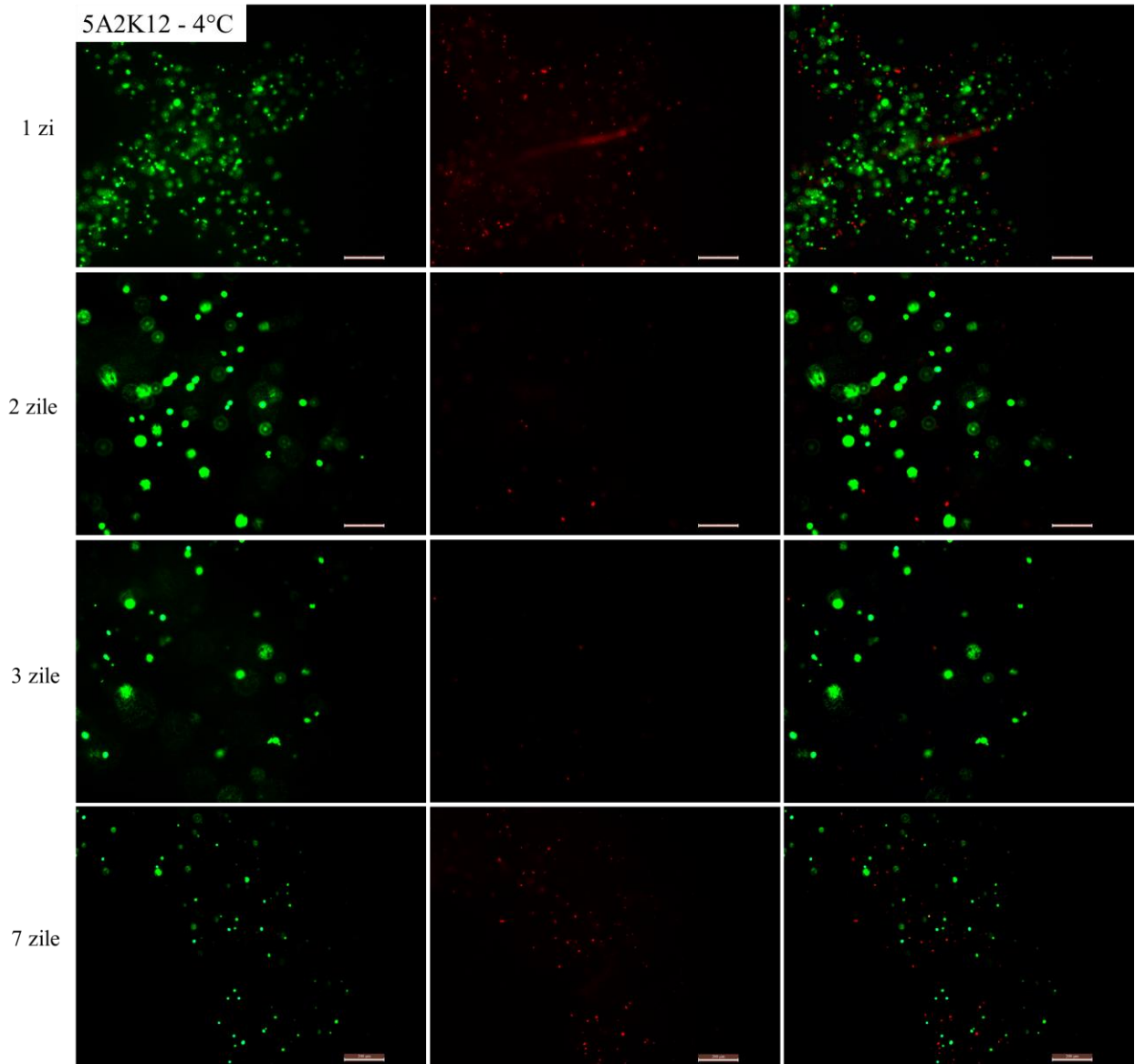


Figura 7. Imaginile de microscopie de fluorescență obținute la 1, 2, 3 și 7 zile de incubare, prin marcarea Live/Dead a probelor pe bază de alginat, K-caragenan și celule osteoblaste MC3T3-E1 (verde - celule vii; roșu – celule moarte; scala de 200μm).

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

I.1.4. Concluzii

Prezentul studiu a avut ca obiectiv dezvoltarea, optimizarea și evaluarea unor formulări printabile aceluare și celulare, cu conținut de celule osteoblaste MC3T3-E1, destinate (bio)printării 3D, având în vedere atât proprietățile reologice și caracteristicile de fidelitate la printare și stabilitate în diferite medii, cât și menținerea stabilității și a viabilității celulare post-printare. Prin investigarea mai multor compoziții polimerice, bazate pe combinația dintre alginat și K-caragenan în diverse concentrații și rapoarte, studiul evidențiază provocările asociate (bio)printării 3D și importanța echilibrului dintre proprietățile fizico-chimice ale materialelor și compatibilitatea biologică.

Optimizarea procesului de gelificare ionică a demonstrat că utilizarea unei soluții de CaCl₂ 2% pentru un timp de expunere de 10 minute reprezintă o condiție adecvată pentru stabilizarea suporturilor printate, asigurând integritatea hidrogelului fără a supune materialul unor condiții ionice excesive. Această abordare este deosebit de relevantă în contextul bioprintării celulare, unde menținerea unui mediu cât mai blând este esențială pentru conservarea viabilității celulelor osteoblaste înglobate în matricei polimerică.

Evaluarea stabilității *in vitro* a suporturilor aceluare a evidențiat faptul că utilizarea soluției Tris 10 mM ca mediu de incubare permite menținerea integrității structurale a structurilor printate pe o perioadă de cel puțin 7 zile. În ceea ce privește printabilitatea, formularea 5A2K21-0.3 s-a remarcat ca fiind optimă, prezentând o fidelitate geometrică superioară, o bună omogenitate și continuitate a filamentului, precum și o stabilitate crescută odată cu creșterea numărului de straturi printate.

În cazul formulărilor celulare, scăderea temperaturii de printare la 4°C a condus la o îmbunătățire semnificativă a printabilității și a fidelității geometrice, efect atribuit gelifierii termice parțiale a K-caragenanului.

Rezultatele testului Live/Dead au indicat o viabilitate ridicată a celulelor osteoblaste MC3T3-E1 în primele 2 zile post-bioprintare, urmată de o scădere progresivă, probabil asociată

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

cu densitatea și rigiditatea matricei hidrogelului. În ansamblu, rezultatele obținute susțin potențialul formulărilor pe bază de alginat și K-caragenan pentru aplicații de bioprintare 3D, subliniind totodată necesitatea optimizării suplimentare a compoziției și a proprietăților matricei pentru menținerea viabilității celulare pe termen mai lung.

Bibliografie

- [1] F. Damiri, A. Fatimi, Y. Liu, A. M. Musuc, A. R. Fajardo, B. H. J. Gawda, L. K. Vora, A. Shavandi, O. V. Okoro. Recent advances in 3D bioprinted polysaccharide hydrogels for biomedical applications: A comprehensive review, Carbohydrate Polymers 348, part B, 2025, 122845, [10.1016/j.carbpol.2024.122845](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2024.122845)
- [2] J. Tan, Y. Luo, Y. Guo, Y. Zhou, X. Liao, D. Li, X. Lai, Y. Liu. Development of alginate-based hydrogels: Crosslinking strategies and biomedical applications, International Journal of Biological Macromolecules 239, 2023, 124275, [10.1016/j.ijbiomac.2023.124275](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.124275)
- [3] K. M. Zia, S. Tabasum, M. Nasif, N. Sultan, N. Aslam, A. Noreen, M. Zuber. A review on synthesis, properties and applications of natural polymer based carrageenan blends and composites. International Journal of Biological Macromolecules 96, 2017, 282–301, [10.1016/j.ijbiomac.2016.11.095](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.11.095)
- [4] S. James, M. Moawad. Study on composite hydrogel mixture of calcium alginate/gelatin/kappa carrageenan for 3D bioprinting, Bioprinting 31, 2023, e00273, [10.1016/j.bprint.2023.e00273](https://doi.org/10.1016/j.bprint.2023.e00273)
- [5] D. M. C. Marques, J. C. Silva, A. P. Serro, J. M. S. Cabral, P. Sanjuan-Alberte, F. C. Ferreira. 3D bioprinting of novel κ -carrageenan bioinks: An algae-derived polysaccharide, Bioengineering 9 (3), 2022, 109, [10.3390/bioengineering9030109](https://doi.org/10.3390/bioengineering9030109)
- [6] S. Tharakan, S. Khondkar, S. Lee, S. Ahn, C. Mathew, A. Gresita, M. Hadjiargyrou, A. Ilyas. 3D Printed Osteoblast–Alginate/Collagen Hydrogels Promote Survival, Proliferation and Mineralization at Low Doses of Strontium Calcium Polyphosphate, Pharmaceutics 15(1), 2022, 11, [10.3390/pharmaceutics15010011](https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15010011)

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

I.2. CAPITOL 2

I.2. Inițierea culturilor celulare pentru liniile RPMI 8226, hMSC-BM și MC3T3-E1

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

Subactivitatea 3.1. Validarea substituenților osoși în modele de șoarece.

I.2.1. Introducere

Inițierea și menținerea liniilor celulare reprezintă etape critice în cercetarea biomedicală, iar succesul acestora depinde în mod direct de respectarea strictă a protocoalelor experimentale și a reglementărilor de lucru aseptice. Tehnica aseptică are rolul de a preveni contaminările microbiologice (bacterii, fungi, micoplasme), care pot compromite viabilitatea celulară, pot altera fenotipul și pot conduce la rezultate experimentale eronate sau ireproductibile [1], [2].

Respectarea condițiilor sterile, utilizarea corectă a hotei cu flux laminar, manipularea adecvată a materialelor și controlul mediului de cultură sunt esențiale pentru asigurarea integrității biologice a culturilor celulare. Aceste principii sunt deosebit de importante în cazul inițierii liniilor celulare, etapă în care celulele sunt mai vulnerabile la stres și contaminare. Aplicarea riguroasă a protocoalelor standardizate garantează reproductibilitatea experimentelor, siguranța personalului și validitatea rezultatelor obținute [3], [4].

MC3T3-E1 este o linie celulară de osteoblaste precursorare de origine murină, utilizată pe scară largă în studiul osteogenezei și al metabolismului osos. Fiind o linie aderentă, MC3T3-E1 necesită manipulare atentă pentru a evita stresul mecanic și contaminarea în timpul inițierii culturii. Respectarea condițiilor sterile și a protocolului standard este esențială pentru menținerea morfologiei, viabilității și capacității de diferențiere osteogenică a acestor celule [5], [6].

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

Celulele stem mezenchimale derivate din măduva osoasă umană (hMSC-BM) sunt celule primare cu capacitate de auto-reînnoire și diferențiere multipotentă. Aceste celule sunt extrem de sensibile la condițiile de cultură și la contaminare, iar tehnica aseptică riguroasă este indispensabilă pentru păstrarea potențialului lor biologic. Inițierea corectă a culturii hMSC-BM este crucială pentru obținerea unor rezultate reproductibile în studiile de regenerare tisulară și inginerie celulară [7], [8].

Linia celulară RPMI 8226 este o linie tumorală umană derivată din plasmocite, utilizată frecvent ca model experimental pentru studiul mielomului multiplu. Aceste celule cresc în suspensie și necesită condiții de cultură atent controlate, inclusiv mediu adecvat și manipulare aseptică strictă. Datorită sensibilității lor la variații de mediu și contaminare, respectarea protocolului de inițiere și întreținere este esențială pentru menținerea viabilității și a caracteristicilor specifice liniei [9], [10].

II.2.2. Matertiale și metode

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

Subactivitatea 3.1. Validarea substituenților osoși în modele de șoarece.

II.2.2.1. Materiale

Liniile celulare MC3T3-E1, RPMI 8226 și hMSC-BM au fost furnizate de Cytion (GmbH, Heidelberg, Germania). Celulele MC3T3-E1 au fost cultivate în mediu α -MEM cu ribonuclezide și deoxiribonucleozide (Sigma Aldrich Merck, Darmstadt, Germany), suplimentat cu 10% ser fetal bovin (FBS; Gibco™, Thermo Fisher Scientific) și 1% soluție de Penicilină-Streptomycină (P-S; Gibco™, Thermo Fisher Scientific). Celulele hMSC-BM au fost cultivate în mediu α -MEM fără ribonuclezide și deoxiribonucleozide (Sigma Aldrich Merck, Darmstadt, Germany), suplimentat cu 10% FBS, 1% soluție P-S și 0.1 μ g fibroblast growth factor (bFGF; Sigma Aldrich Merck, Darmstadt, Germany). Celulele rpmi 8226 au fost cultivate în mediu RPMI 1640 cu glutamină (Cytion, Darmstadt, Germany), suplimentat cu

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

10% FBS, 1% soluție P-S. Soluțiile de tampon fosfat salin (PBS) și de dimetilsulfoxid (DMSO) a fost furnizate de Sigma Aldrich Merck (Darmstadt, Germany), iar tripsina de Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, SUA)

II.2.2.2. Dezghețarea și inițierea liniilor celulare

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

Subactivitatea 3.1. Validarea substituenților osoși în modele de șoarece.

II.2.2.2.1. Dezghețarea și inițierea liniei celulare MC3T3-E1

Linia celulară MC3T3-E1 a fost inițiată în cultură folosind mediu α -MEM suplimentat cu ribonucleozide și deoxiribonucleozide, 10% FBS și 1% P-S. Criotubul conținând celulele a fost dezghețat rapid într-o baie cu bile metalice la 37°C, dezinfectat cu etanol 70% și transferat în hota cu flux laminar. Suspensia celulară a fost omogenizată prin pipetare ușoară, iar conținutul criotubului (1,5 mL) a fost transferat într-un tub de centrifugare de 15 mL conținând 8 mL de mediu complet, pentru a reduce concentrația agentului crioprotector.

Suspensia celulară a fost centrifugată la 300 rpm timp de 6 minute. După îndepărtarea supernatantului, celulele au fost resuspendate în 1 mL de mediu complet și însămânțate în 2 flask-uri T25 pentru celule aderente. Flask-urile au fost incubate în condiții standard de cultură (37°C, 5% CO₂, atmosferă umidificată), favorizând aderarea celulară și proliferarea osteoblastelor precursorare.

II.2.2.2.2. Dezghețarea și inițierea liniei celulare hMSC-BM

Celulele stem hMSC-BM au fost dezghețate și cultivate utilizând mediu α -MEM fără ribonucleozide și deoxiribonucleozide, suplimentat cu 10% FBS, 1% P-S, 0.1 μ g bFGF. Criotubul a fost dezghețat la 37°C, dezinfectat cu etanol 70% și introdus în hota cu flux laminar.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

Suspensia celulară a fost omogenizată, iar conținutul de 1,5 mL a fost transferat într-un tub de conținând 8 mL de mediu complet, pentru diluarea progresivă a crioprotectorului.

Celulele au fost centrifugate la 500 rpm timp de 4 minute, după care supernatantul a fost îndepărtat, iar sedimentul celular a fost resuspendat în 1 mL de mediu complet. Suspensia celulară a fost distribuită în 2 flask-uri T25 pentru celule aderente, care conțineau mediu complet preîncălzit. Toate flask-urile au fost incubate la 37°C și 5% CO₂, permițând aderarea celulară și menținerea caracteristicilor biologice specifice celulelor stem mezenchimale.

II.2.2.2.3. Dezghețarea și inițierea liniei celulare RPMI 8226

Linia celulară RPMI 8226 a fost inițiată cultură utilizând mediu RPMI 1640 complet, suplimentat cu 10% FBS și 1% soluție de P-S. Criotubul conținând celulele a fost dezghețat într-o baie cu bile metalice la 37°C, urmat de dezinfectarea exteriorului cu etanol 70% și transferul acestuia în hota cu flux laminar pentru manipulare aseptică. Suspensia celulară a fost omogenizată prin pipetare ușoară, iar conținutul criotubului (1,5 mL) a fost transferat într-un tub de centrifugare, care conținea 8 mL de mediu RPMI 1640 complet, adăugat lent pentru a preveni stresul osmotic și aglomerarea celulară.

Suspensia celulară a fost centrifugată la 600 rpm timp de 4 minute, pentru sedimentarea celulelor și îndepărtarea agentului crioprotector. După centrifugare, supernatantul a fost eliminat, iar sedimentul celular a fost resuspendat în 1 mL de mediu complet proaspăt. Celulele au fost transferate într-un flask T25 destinat culturilor în suspensie, conținând mediu RPMI 1640 complet, și incubate la 37°C, în condiții standard, pentru a permite reluarea proliferării celulare.

II.2.2.3. Pasajul celular

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

Subactivitatea 3.1. Validarea substituenților osoși în modele de șoarece.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

II.2.2.3.1. Pasajul celular MC3T3-E1

Pasajul celular al liniei MC3T3-E1 a fost realizat în condiții sterile, utilizând mediu α -MEM suplimentat complet. Toate manipulările au fost efectuate în hotă cu flux laminar, iar culturile au fost menținute în incubator la 37°C, într-o atmosferă umidificată cu 5% CO₂. Înainte de inițierea procedurii, mediul de cultură, soluția PBS și soluția de detasare enzimatică (tripsina) au fost preîncălzite pentru a preveni stresul termic asupra celulelor. Mediul de cultură a fost îndepărtat din flask-urile confluențe, iar monostratul celular a fost spălat ușor cu 3 mL PBS pentru a elimina resturile de ser și metaboliții reziduali care ar putea inhiba activitatea enzimatică. Ulterior, s-a adăugat 1 mL de tripsină în fiecare flask, iar culturile au fost incubate timp de 3 minute la 37°C, până la detașarea completă a celulelor de pe suprafața de cultură. Procesul de detașare a fost oprit prin adăugarea a 3 mL de mediu complet, iar suspensia celulară a fost omogenizată prin pipetare repetată pentru a obține o distribuție uniformă a celulelor. Conținutul celor două flask-uri inițiale a fost redistribuit în câte șase flask-uri noi, rezultând un total de 12 flask-uri, fiecare conținând 4 mL de mediu complet proaspăt. Flask-urile au fost incubate în condiții standard de cultură pentru a permite reatașarea și proliferarea celulelor. Schimbarea mediului s-a realizat după 2-3 zile pentru a asigura condiții optime de viabilitate și funcționalitate celulară. Această procedură a permis atât menținerea culturilor sănătoase, cât și pregătirea acestora pentru teste experimentale ulterioare. Pasajul celular s-a repetat de fiecare dată când celulele au ajuns la confluență până la obținerea de 24 de flask-uri de 75 cm².

II.2.2.3.2. Pasajul celular hMSC-BM

Pasajul celular al hMSC-BM a fost efectuat în condiții strict aseptice, utilizând mediu α -MEM fără ribonuclezide și deoxiribonucleozide și suplimentat complet. Înainte de inițierea procedurii, toate soluțiile utilizate, inclusiv mediul de cultură, PBS-ul și tripsina au fost preîncălzite la temperatura de lucru pentru a preveni stresul termic asupra celulelor. Mediul de cultură a fost îndepărtat din flask-uri, iar monostratul celular a fost spălat ușor cu 4 mL PBS

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

pentru îndepărtarea resturilor de ser și a metaboliților reziduali. Ulterior, în fiecare flask s-a adăugat 1 mL de tripsină, iar culturile au fost incubate timp de aproximativ 3 minute la 37°C, până la detașarea completă a celulelor. Inactivarea tripsinei s-a realizat prin adăugarea a 5 mL de mediu complet, iar suspensia celulară a fost omogenizată prin pipetare repetată.

Suspensia celulară obținută a fost transferată în tuburi de 15 mL și centrifugată la 1000 rpm timp de 5 minute, pentru sedimentarea celulelor. După centrifugare, supernatantul a fost îndepărtat, iar sedimentul celular a fost resuspendat în 1 mL de mediu complet proaspăt. Celulele au fost numărate, determinându-se o concentrație totală de aproximativ $1,2 \times 10^6$ celule/mL. Pe baza numărului celular determinat, suspensia a fost diluată corespunzător, iar câte 2×10^5 celule au fost însămânțate în flask-uri noi (de 25 cm²), fiecare conținând 5 mL de mediu complet. Flask-urile au fost ulterior incubate în condiții standard de cultură, pentru a permite reatașarea și proliferarea celulelor hMSC-BM. Mediul de cultură a fost înlocuit la intervale de 2–3 zile, în vederea menținerii condițiilor optime necesare supraviețuirii și activității funcționale a celulelor, precum și pentru pregătirea acestora în vederea experimentelor ulterioare. Etapele pasajului celular s-au repetat atunci când cultura a ajuns la confluență până la atingerea unui număr de 12 flask-uri de 75 cm².

II.2.2.3.3. Pasajul celular RPMI 8226

Pasajul celular al liniei RPMI 8226, o linie tumorală umană care crește în suspensie, a fost realizat utilizând mediu RPMI 1640 complet suplimentat. Toate etapele au fost efectuate în condiții sterile, iar mediul de cultură a fost preîncălzit înainte de utilizare pentru a asigura condiții optime de manipulare celulară. Suspensia celulară a fost colectată prin transferul întregului volum de cultură din flask într-un tub de centrifugare de 15 mL, obținându-se un volum total de aproximativ 11,5 mL. Suspensia a fost supusă centrifugării la 1000 rpm timp de 3 minute, pentru sedimentarea celulelor și separarea acestora de mediul uzat. După

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

centrifugare, supernatantul a fost îndepărtat cu atenție, iar sedimentul celular a fost resuspendat în 1 mL de mediu RPMI 1640 proaspăt, obținându-se o suspensie celulară omogenă.

Pentru evaluarea densității celulare și a viabilității, un volum de 20 μ L din suspensia celulară a fost amestecat cu 20 μ L de soluție de albastru tripan, iar celulele au fost numărate utilizând o cameră de numărare. În urma acestei analize, s-a determinat o concentrație celulară de aproximativ 6×10^6 celule/mL. Pe baza acestei concentrații, suspensia celulară a fost diluată corespunzător, iar câte 5×10^5 celule au fost însămânțate în fiecare dintre cele 11 flask-uri T25, fiecare conținând 5 mL de mediu complet proaspăt. Flask-urile au fost incubate la 37°C, iar schimbarea periodică a mediului de cultură, s-a realizat la fiecare 2–3 zile, pentru asigurarea unui microambient favorabil viabilității și funcționalității celulare, contribuind totodată la stabilizarea culturilor înainte de realizarea testelor experimentale. Pasajul celular a fost repetat de fiecare dată când celulele au ajuns la confluență până la obținerea de 22 de flask-uri de 75 cm^2 .

II.2.2.4. Înghețarea culturilor celulare

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

Subactivitatea 3.1. Validarea substituenților osoși în modele de șoarece.

II.2.2.4.1. Înghețarea culturii celulare MC3T3-E1

Procedura de crioconservare a fost realizată în condiții sterile, sub hota cu flux laminar vertical. Înainte de începerea experimentului, s-a stabilit numărul de criotuburi necesare, fiecare fiind etichetat corespunzător cu denumirea liniei celulare, data și numărul pasajului. Pentru fiecare flask de 75 cm^2 au fost pregătite două criotuburi. DMSO-ul a fost filtrat steril, iar ulterior s-a preparat mediul de crioconservare, conținând 10% DMSO în mediu complet α -MEM. Pentru crioconservarea celulelor provenite din 23 de flask-uri T75, a fost preparat un volum total de 69 ml mediu cu DMSO. Mediul de cultură a fost îndepărtat din flask-uri, iar celulele au fost spălate de două ori cu câte 5 ml PBS. Ulterior, s-au adăugat 2 ml tripsină în

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

fiecare flask, lăsându-se până la detașarea completă a celulelor. Reacția a fost stopată prin adăugarea de mediu complet. Suspensia celulară a fost colectată și centrifugată la 1300 rpm timp de 3 minute. După centrifugare, supernatantul a fost îndepărtat, iar pelletul celular a fost resuspendat în mediul de crioconservare, utilizându-se 1,5 ml mediu cu DMSO pentru fiecare criotub. În total, au fost pregătite 46 de criotuburi. Suspensia celulară a fost omogenizată cu atenție, iar câte 1,5 ml au fost distribuiți în fiecare criotub. Capacele criotuburilor au fost dezinfectate cu etanol, după care acestea au fost depozitate la -80°C pentru crioconservare. Toate criotuburile au fost depozitate în condiții de congelare conform protocolului standard.

II.2.2.4.2. Înghețarea culturii celulare hMSC-BM

Pentru cultura celulară hMSC-BM s-au pregătit pentru fiecare flask de 75 cm² câte trei criotuburi. DMSO-ul a fost filtrat, după care s-a preparat mediul de crioconservare, având în compoziție 80% FBS, 9% mediu complet α -MEM, 1% P-S și 10% DMSO, până la un volum final de 100 ml. Mediul de cultură a fost îndepărtat din flask-uri, iar celulele au fost spălate de două ori cu câte 5 ml PBS. Ulterior, în fiecare flask s-au adăugat 2 ml tripsină, iar celulele au fost lăsate la incubat până la detașarea completă. Reacția a fost neutralizată prin adăugarea de mediu complet. Suspensia a fost colectată și centrifugată la 1300 rpm timp de 3 minute. După centrifugare, supernatantul a fost îndepărtat, iar pelletul celular a fost resuspendat în mediul de crioconservare, utilizându-se 1,5 ml pentru fiecare criotub. În total, au fost pregătite 33 de criotuburi. Capacele criotuburilor au fost dezinfectate cu etanol, poziționate vertical într-o cutie adecvată și depozitate la -80°C pentru crioconservare.

II.2.2.4.3. Înghețarea culturii celulare RPMI 8226

Procedura de crioconservare a liniei celulare RPMI 8226 a fost realizată conform protocolului standard de înghețare celulară utilizând mediu suplimentat cu DMSO. La începutul procedurii, a fost stabilit numărul necesar de criotuburi, fiecare fiind etichetat cu

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

denumirea liniei celulare, data efectuării și numărul pasajului. Pentru fiecare flask de 75 cm² au fost alocate două criotuburi. DMSO-ul a fost filtrat, după care s-a preparat mediul de crioconservare conținând 10% DMSO în mediu complet RPMI. Au fost crioconservate celulele provenite din 21 de flask-uri T75, utilizându-se 1,5 ml suspensie celulară per criotub. Supernatantul de cultură a fost îndepărtat din flask-uri, iar suspensia celulară a fost colectată și centrifugată la 1300 rpm timp de 3 minute. După centrifugare, supernatantul a fost eliminat, iar pelletul celular a fost resuspendat în mediul de crioconservare, utilizându-se 1,5 ml pentru fiecare criotub. Suspensia celulară a fost omogenizată cu atenție, iar câte 1,5 ml au fost distribuiți în 42 de criotuburi sterile. Capacele criotuburilor au fost dezinfectate cu etanol, iar criotuburile au fost poziționate vertical într-o cutie adecvată și depozitate la -80°C pentru crioconservare. Toate criotuburile au fost stocate în condiții de congelare conform protocolului experimental.

II.2.2.5. Evaluarea viabilității celulare după inițierea și înghețarea liniilor celulare

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

Subactivitatea 3.1. Validarea substituenților osoși în modele de șoarece.

Evaluarea viabilității celulare după inițierea culturii și crioconservare a fost realizată pe liniile celulare RPMI 8226, MC3T3-E1 și hMSC-BM, utilizând protocoale standardizate de decongelare și reculturare celulară. Pentru fiecare linie celulară a fost utilizat mediul de cultură specific, adaptat cerințelor biologice ale acesteia. Linia celulară RPMI 8226 a fost menținută în mediu complet RPMI 1640, suplimentat cu 10% FBS și 1% P-S. Pentru linia MC3T3-E1 s-a utilizat mediu complet α -MEM suplimentat cu ribonucleozide și deoxiribonucleozide, 10% FBS și 1% P-S, iar pentru linia hMSC-BM s-a utilizat mediu complet α -MEM fără ribonucleozide și deoxiribonucleozide, suplimentat identic cu FBS și P-S, dar și cu bFGF. Decongelarea celulelor a fost realizată din criotuburi conținând suspensii celulare

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

crioconservate, utilizând tuburi sterile de centrifugare de 15 ml, flask-uri de 25 cm² pentru culturi aderente sau în suspensie, precum și consumabile sterile specifice culturii celulare.

Criotuburile au fost extrase din congelator și introduse imediat într-o baie termostatăă cu bile pentru a permite decongelarea rapidă a suspensiei celulare. După dezghețate, suprafața exterioară a criotuburilor a fost dezinfectată cu etanol 70%, iar acestea au fost transferate în hota cu flux laminar pentru manipulare aseptică. Conținutul fiecărui criotub a fost omogenizat ușor, iar volumul total de 1,5 ml a fost transferat lent într-un tub steril de 15 ml, care conținea anterior 8 ml de mediu complet corespunzător fiecărei linii celulare. Transferul suspensiei a fost realizat gradual, de la baza tubului spre suprafață, pentru a reduce stresul mecanic asupra celulelor.

Suspensiile celulare astfel obținute au fost centrifugate la 1300 rpm timp de 3 minute, cu scopul îndepărtării agentului crioprotector (DMSO). După centrifugare, supernatantul a fost eliminat, iar sedimentul celular a fost resuspendat în 1 ml de mediu complet proaspăt. Celulele au fost ulterior transferate în flask-uri de 25 cm², utilizându-se flask-uri pentru culturi aderente în cazul liniilor MC3T3-E1 și hMSC-BM și flask-uri dedicate culturilor în suspensie pentru linia RPMI 8226. După însămânțare, culturile celulare au fost menținute în condiții standard de incubare.

Viabilitatea celulară și capacitatea de recuperare post-dezghețare au fost evaluate prin microscopie optică. Imagini reprezentative au fost înregistrate imediat după decongelare, precum și la 24 de ore de cultură, pentru a urmări morfologia celulară, atașarea celulelor aderente și dinamica generală a culturilor, oferind astfel informații relevante privind succesul procesului de crioconservare și recuperare celulară.

II.2.3. Rezultate și discuții

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

Subactivitatea 3.1. Validarea substituenților osoși în modele de șoarece.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

Viabilitatea celulară și capacitatea de recuperare după procesul de crioconservare au fost evaluate prin analiză morfologică la microscop optic, imediat după dezghețare și la 24 de ore de la inițierea culturii. Observațiile efectuate au evidențiat o recuperare eficientă a tuturor liniilor celulare investigate, confirmând succesul etapelor de crioconservare, dezghețare și reculturare.

Imediat după dezghețare, celulele din toate cele trei linii au prezentat o morfologie rotundă, specifică stării de suspensie tranzitorii și procesului de adaptare la noul mediu de cultură. La 24 de ore de incubare în condiții standard (37°C, 5% CO₂), s-au observat diferențe morfologice conforme cu caracteristicile biologice specifice fiecărei linii celulare (Figura 1).

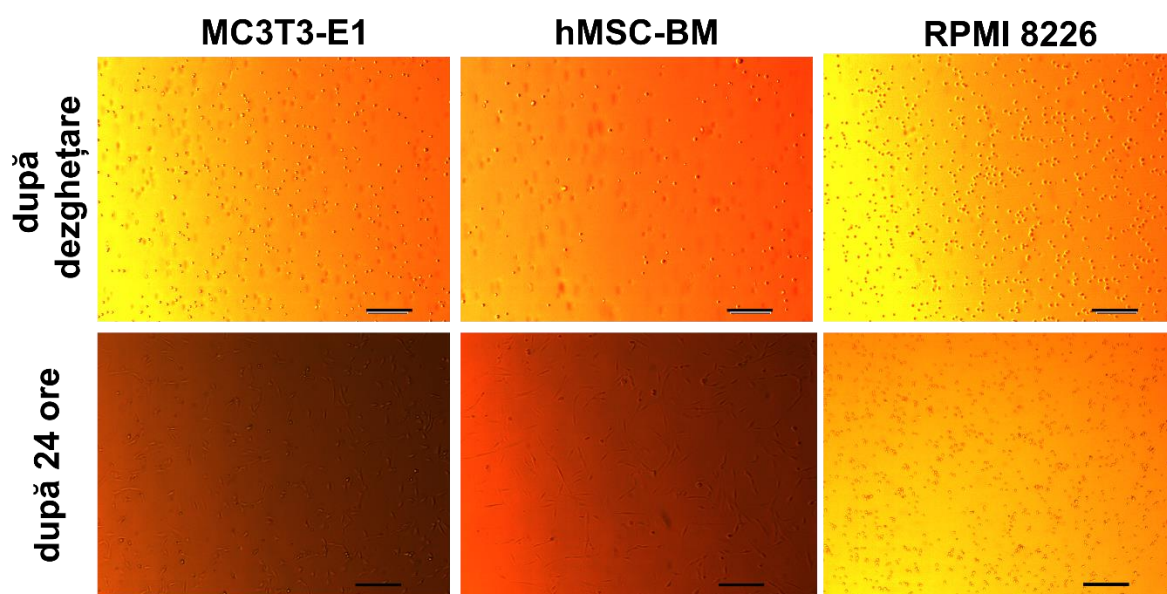


Figura 1. Imagini de microscopie optică ale celulelor recultivate pentru evaluarea viabilității post-crioconservare imediat după dezghețare și la 24 de ore (scala μm).

Pentru linia celulară MC3T3-E1, celulele au prezentat o morfologie tipic osteoblastă, alungită, cu extinderi citoplasmatiche evidente și organizare în monocouche aderentă la suprafața flask-ului. Gradul crescut de atașare și distribuția uniformă indică o bună capacitate

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

de aderență și reluare a proliferării post-dezghețare. În cazul liniei hMSC-BM, s-a observat o morfologie caracteristică celulelor stem mezenchimale, cu aspect fusiform, contur celular bine definit și atașare fermă la substrat. Prezența celulelor aderente, cu morfologie specifică și fără semne evidente de fragmentare sugerează menținerea integrității structurale și a viabilității post-crioconservare.

Pentru linia celulară RPMI 8226, specifică culturilor în suspensie, celulele au rămas distribuite uniform în mediu, menținând morfologia sferică caracteristică. Absența agregatelor masive sau a fragmentelor celulare abundente indică o rată bună de supraviețuire și adaptare la condițiile de cultură post-dezghețare. Comparativ cu momentul imediat post-decongelare, la 24 de ore s-a constatat o clară stabilizare morfologică și adaptare la mediul specific fiecărei linii, evidențiind capacitatea celulelor de a-și relua funcțiile biologice normale. În cazul liniilor aderente (MC3T3-E1 și hMSC-BM), procesul de atașare a fost complet în intervalul analizat, iar pentru linia RPMI 8226 s-a menținut comportamentul tipic de cultură în suspensie.

II.2.4. Concluzii

Studiul de față a avut ca obiectiv inițierea, menținerea, crioconservarea și evaluarea viabilității post-dezghețare pentru trei linii celulare distincte: MC3T3-E1, hMSC-BM și RPMI 8226, utilizând protocoale standardizate și medii de cultură adaptate cerințelor biologice specifice fiecărei linii. Rezultatele obținute demonstrează că procedurile aplicate pentru dezghețare, pasaj celular și crioconservare au fost eficiente, asigurând menținerea integrității structurale și a caracteristicilor fenotipice ale celulelor. Evaluarea morfologică realizată prin microscopie optică a evidențiat o recuperare adecvată a culturilor la 24 de ore post-dezghețare, confirmând succesul procesului de stocare la temperaturi scăzute și al reluării culturii.

În cazul liniilor aderente MC3T3-E1 și hMSC-BM, celulele au prezentat o morfologie specifică și o capacitate optimă de reatașare la substrat, cu formarea unui monostrat celular uniform și absența semnelor evidente de deteriorare sau fragmentare. Aceste observații indică

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

menținerea potențialului proliferativ și a proprietăților biologice caracteristice osteoblastelor precursorare și celulelor stem mezenchimale. Pentru linia RPMI 8226, cultivată în suspensie, s-a constatat păstrarea morfologiei sferice și distribuția uniformă a celulelor în mediu, fără formarea de agregate excesive sau detritus celular semnificativ. Acest comportament confirmă o rată bună de supraviețuire și adaptare post-crioconservare, precum și stabilitatea culturii în condiții standard de incubare. În ansamblu, datele obținute validează protocoalele utilizate pentru manipularea, pasajul și crioconservarea celor trei linii celulare, demonstrând că acestea permit conservarea viabilității și a caracteristicilor morfologice specifice.

Bibliografie

- [1] C. Wertheimer *et al.*, “A cell culture technique for human epiretinal membranes to describe cell behavior and membrane contraction in vitro,” *Graefe’s Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* 2017 255:11, vol. 255, no. 11, pp. 2147–2155, Aug. 2017, doi: 10.1007/S00417-017-3767-X.
- [2] T. Bykowski and B. Stevenson, “Aseptic Technique,” *Curr. Protoc. Microbiol.*, vol. 56, no. 1, p. e98, Feb. 2020, doi: 10.1002/CPMC.98;JOURNAL:JOURNAL:19348533;WGROU:STRING:PUBLICATION.
- [3] Y. Imai, A. Watanabe, P. I. Chang, and E. Masuhara, “Evaluation of the Biologic Effects of Dental Materials Using a New Cell Culture Technique,” *J. Dent. Res.*, vol. 61, no. 8, pp. 1024–1027, 1982, doi: 10.1177/00220345820610080601.
- [4] A. M. Aziz, “Variations in aseptic technique and implications for infection control.,” *Br. J. Nurs.*, vol. 18, no. 1, pp. 26–31, 2009, doi: 10.12968/BJON.2009.18.1.32073;SUBPAGE:STRING:ABSTRACT;ISSUE:ISSUE:DOI.
- [5] W. N. Addison *et al.*, “Extracellular matrix mineralization in murine MC3T3-E1 osteoblast cultures: An ultrastructural, compositional and comparative analysis with mouse bone,” *Bone*, vol. 71, pp. 244–256, Feb. 2015, doi: 10.1016/J.BONE.2014.11.003.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

- [6] M. Izumiya *et al.*, “Evaluation of MC3T3-E1 Cell Osteogenesis in Different Cell Culture Media,” *International Journal of Molecular Sciences* 2021, Vol. 22, Page 7752, vol. 22, no. 14, p. 7752, Jul. 2021, doi: 10.3390/IJMS22147752.
- [7] T. R. J. Heathman *et al.*, “Characterization of human mesenchymal stem cells from multiple donors and the implications for large scale bioprocess development,” *Biochem. Eng. J.*, vol. 108, pp. 14–23, Apr. 2016, doi: 10.1016/J.BEJ.2015.06.018.
- [8] Y. Wang *et al.*, “Outgrowth of a transformed cell population derived from normal human BM mesenchymal stem cell culture,” *Cytotherapy*, vol. 7, no. 6, pp. 509–519, 2005, doi: 10.1080/14653240500363216.
- [9] T. Mano, M. Taya, M. Taniguchi, and T. Kobayashi, “Continuous culture of RPMI 8226 human cells,” *Journal of Fermentation Technology*, vol. 65, no. 4, pp. 425–429, Jan. 1987, doi: 10.1016/0385-6380(87)90139-7.
- [10] S. Brune, D. Schepmann, K. Lehmkuhl, B. Frehland, and B. Wünsch, “Characterization of Ligand Binding to the $\sigma 1$ Receptor in a Human Tumor Cell Line (RPMI 8226) and Establishment of a Competitive Receptor Binding Assay,” <https://home.liebertpub.com/adt>, vol. 10, no. 4, pp. 365–374, Aug. 2012, doi: 10.1089/ADT.2011.0376.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE
POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

PARTEA a II-a

Capitolul 1

II.1. Bioprintarea formulărilor pe bază de alginat, K-caragenan și spirulină în amestec cu celule osteoblaste MC3T3-E1

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

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

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

II.1.1. Introducere

Printarea 3D este o tehnologie de fabricație aditivă care creează structuri tridimensionale complexe prin depunerea controlată, strat cu strat, a materialelor pe baza unor modele digitale. O extensie a acesteia, bioprintarea 3D, utilizează bio-cerneluri ce conțin materiale biocompatibile și celule vii, pentru a obține structuri biomimetice destinate ingineriei tisulare, medicinei regenerative și studiilor *in vitro* [1].

În bioprintare, alegerea materialelor este crucială pentru a garanta o bună printabilitate, stabilitate structurală și compatibilitate biologică. Alginatul de sodiu, un biopolimer natural obținut din alge brune, este frecvent utilizat datorită biocompatibilității sale, capacității de gelificare rapidă prin mecanism ionic și ușurinței în procesare. Totuși, acesta prezintă anumite

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

limitări, în special în ceea ce privește proprietățile mecanice și absența motivelor de adeziune celulară [2]. Pe de altă parte, K-caragenanul, o altă polizaharidă naturală extrasă din alge roșii, este valoros pentru abilitatea sa de a forma geluri stabile, rigiditatea structurală și comportamentul reologic adecvat proceselor de printare [3]. În acest context, spirulina poate fi integrată în matricea polimerică alcătuită din alginat și K-caragenan, pentru a îmbunătăți funcționalitatea biologică, datorită conținutului său ridicat de proteine și compuși bioactivi, care pot prezenta efect antiinflamator și antialergic, dar pot susține și viabilitatea celulară [4]. De asemenea, prezența sa poate influența proprietățile reologice și structurale ale formulării, contribuind la optimizarea procesului de printare și a stabilității structurii obținute.

Combinarea alginatului de sodiu cu K-caragenanul constituie o abordare eficientă pentru dezvoltarea unor formulări printabile cu performanțe superioare. Interacțiunea sinergică dintre cei doi polimeri permite reglarea vâscozității, a proprietăților reologice și a stabilității mecanice, favorizând în același timp o fidelitate geometrică mai ridicată. În plus, pregelifierea alginatului crește vâscozitatea și asigură comportamentul pseudoplastic necesar pentru extrudare controlată și păstrarea formei structurilor printate [5].

După bioprintare, structurile sunt stabilizate prin gelifiere ionică, cu clorură de calciu (CaCl_2). Ioni de Ca^{2+} formează legături între lanțurile de alginat, generând o rețea tridimensională stabilă. Parametrii precum concentrația și timpul de expunere la CaCl_2 influențează proprietățile mecanice, porozitatea și stabilitatea hidrogelului, afectând implicit mediul celular încapsulat [6].

Linia celulară MC3T3-E1, provenită din precursori osteoblastici, este utilizată ca model *in vitro* pentru studiul osteogenezei. Integrarea acestor celule în formulări pe bază de alginat, K-caragenan și spirulină permite evaluarea biocompatibilității și a potențialului lor pentru ingineria țesutului osos [7]. Astfel, dezvoltarea unor formulări printabile adecvate pentru

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

bioprintarea 3D reprezintă un pas important în obținerea unor structuri biomimetice funcționale.

II.1.2. Materiale, sinteză și metode

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

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

II.1.2.1. Materiale

Alginatul de sodiu (A), K-caragenanul (K) și clorura de calciu (CaCl_2) au fost achiziționate de la Sigma-Aldrich. Spirulina sub formă de pulbere uscată provine de la compania Spring Markt, iar linia celulară MC3T3-E1 a fost achiziționată de la Cytion, Cell Line Service (CLS; Eppelheim, Germany) și menținută prin pasaje succesive, așa cum s-a detaliat în rapoartele anterioare. Mediul de cultură Alpha-Minimum Essential Medium (α -MEM), serul fetal bovin (FBS), penicilina-streptomicina (P-S), colorantul Albastru Tripan, tripsina și pachetele pentru obținerea soluției saline cu fosfat (PBS) au fost furnizate de Thermo Scientific. 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 μm .

II.1.2.2. Sinteza formulărilor printabile acelulare și procesul de printare 3D

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

În scopul evaluării capacității de printare 3D, s-a optimizat compoziția formulării printabile acelulare, sintetizându-se mai multe amestecuri polimerice pe bază de alginat de sodiu, K-caragenan (AK) și spirulină, în care s-au variat fie concentrația de A, fie concentrația

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

de K, fie cea de CaCl₂ din etapa de pregelifiere, fie raportul masic dintre cei doi polimeri, conform **tabelului 1**.

Tabelul 1. Codificarea probelor, concentrațiile soluțiilor utilizate și optimizarea parametrilor de printare

Cod formulare	Conc. A (%)	Conc. K (%)	Raportul masic dintre A și K	Conc. CaCl ₂ * pregelifiere (%)	Conc. Spirulina (%)	Lungime × Lățime × Înălțime (mm × mm × mm)	Presiune de extrudare (kPa)	Viteză de printare (mm s ⁻¹)
3A1K11	3	1	1:1	0,125	-	10 × 10 × 1	30	8 – 10
3A1K21	3	1	2:1	0,125	-		20 – 30	8 – 10
3A2K11	3	2	1:1	0,125	-		50	8
3A2K21	3	2	2:1	0,125	-		40 – 50	8
4A1K11	4	1	1:1	0,125	-		40	8
4A1K21	4	1	2:1	0,125	-		30 – 40	8
4A2K11	4	2	1:1	0,125	-		50	8
4A2K21	4	2	2:1	0,125	-		50	8
4A2K11-1.0	4	2	1:1	0,125	1		40	8
4A2K21-1.0	4	2	2:1	0,125	1		40	8
4A1K11	4	1	1:1	0,250	-		65	7
4A1K21	4	1	2:1	0,250	-		65	7
4A2K11	4	2	1:1	0,250	-		60 – 65	7
4A2K21	4	2	2:1	0,250	-		55 – 65	7 – 8
4A2K11-1.0	4	2	1:1	0,250	1		60 – 65	6

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

4A2K21-1.0	4	2	2:1	0,250	1		65	6
------------	---	---	-----	-------	---	--	----	---

* raportat la volumul soluției

Metoda de obținere a formulărilor printabile aceluare detaliate în **tabelul 1** a presupus amestecarea celor două soluții de polimeri în rapoarte bine stabilite.

Solubilizarea separată a polimerilor s-a realizat astfel:

- alginatul de sodiu (6% și 8% m/v) s-a solubilizat în 10 mL apă ultrapură, sub agitare magnetică, la 60°C și în prealabil, 0.250%, respectiv 0.500% (m/v) CaCl₂ s-a dizolvat într-un alt volum de 10 mL apă ultrapură, apoi peste soluțiile de alginat de sodiu (6%, respectiv 8%), s-au adăugat în picătură cei 10 mL soluție CaCl₂ 0.250%, respectiv 0.500% sub agitare magnetică viguroasă, pentru a obține un volum final de 20 mL soluție cu concentrația finală de 3%, respectiv 4% (m/v) alginat de calciu pregelifiată cu un conținut de 0.125% - 0.250% (m/v) CaCl₂, conform **tabelului 1**;
- K-caragenan (1% și 2% m/v) s-a solubilizat în 20 mL apă ultrapură cu agitare magnetică viguroasă timp de aproximativ o oră, pe o baie de apă încălzită la 80°C.

Formulările astfel obținute au fost turnate în cartușe de 3 mL prevăzute cu ac metalic cu diametru interior de 330 μm și menținute în frigider, la temperatura de 3°C timp de 30 minute, ulterior putând fi utilizate în procesul de printare 3D, după ce parametrii de printare au fost optimizați (**tabelul 1**). Procesul de printare 3D s-a realizat prin depunerea materialului în manieră strat cu strat pe o lamă de sticlă, sub acțiunea presiunii pneumatice, utilizând echipamentul de printare 3D Discovery (RegenHU, Villaz-St-Pierre) și software-ul BioCAD care a generat protocolul de printare sub forma codului G.

Probele printate 3D au fost supuse unei gelifieri ionice prin imersarea acestora într-o soluție apoasă de 1% CaCl₂, unde au fost menținute timp de 5 minute. Ulterior, probele au fost spălate cu apă ultrapură pentru a îndepărta ionii de Ca²⁺ nereacționați.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

II.1.2.3. Sinteza formulărilor printabile celulare

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

În scopul evaluării capacității de bioprintare în prezența celulelor osteoblaste MC3T3-E1, s-au sintetizat mai multe formulări polimerice pe bază de alginat, K-caragenan și spirulină, în care s-a variat raportul masic dintre cei doi polimeri și concentrația de spirulină raportată la volumul final al amestecului. 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 a presupus solubilizarea separată a celor doi polimeri, astfel:

- 8% (m/v) alginat de sodiu s-a solubilizat în 10 mL apă ultrapură, sub agitare magnetică, la temperatura de 60°C, timp de două ore și 0.5% (m/v) CaCl₂ s-a dizolvat într-un alt volum de 10 mL apă ultrapură, apoi peste soluția de 8% alginat de sodiu, s-au adăugat în picătură cei 10 mL soluție 0.5% CaCl₂ sub agitare magnetică viguroasă, pentru a obține un volum final de 20 mL soluție cu concentrația finală de 4% (m/v) alginat de calciu pregelifiată cu un conținut de 0.25% (m/v) CaCl₂;

- 2% (m/v) K-caragenan s-a solubilizat în 20 mL apă ultrapură, cu agitare magnetică viguroasă la 80°C timp de aproximativ o oră;

- 0.5%, respectiv 1.0% (m/v) spirulină raportată la volumul amestecului final, a fost adăugată prin omogenizare magnetică, la temperatura de 40°C.

Ulterior, soluțiile astfel obținute s-au amestecat în rapoarte bine stabilite pentru a obține formulările prezentate în **tabelul 2**, unde sunt specificate și codificările, concentrațiile și parametrii de bioprintare utilizați. Probele printate au fost supuse unei gelifieri ionice prin imersare într-o soluție de 1% CaCl₂, unde s-au menținut timp de 5 minute.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

Tabelul 2. Parametrii de bioprintare 3D a formulărilor celulare

Cod formulare	Conc. Alginat (A) (%)	Conc. K-caragenan (K) (%)	Raport masic între A și K	Conc. Spirulină* (%)	Conc. CaCl ₂ * pregelifiere (%)	Lungime × Lățime × Înălțime (mm × mm × mm)	Presiune de extrudare (kPa)	Viteză de printare (mm s ⁻¹)
4A2K11	4	2	1:1	-	0.250	10 × 10 × 1	45 – 65	7 – 8
4A2K21	4	2	2:1	-	0.250		45 – 65	8.5 – 10
4A2K11-1.0	4	2	1:1	1.0	0.250		55 – 65	6 – 6.5
4A2K21-1.0	4	2	2:1	1.0	0.250		55 – 60	6 – 7.5
4A2K21 (repetare)	4	2	2:1	-	0.250		60 – 85	7
4A2K21-0.5	4	2	2:1	0.5	0.250		75 – 80	7
4A2K21-1.0 (repetare)	4	2	2:1	1.0	0.250		75 – 100	6.5

* raportat la volumul amestecului final

II.1.2.4. Pregătirea suspensiei celulare și însămânțare în formulările printabile

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 costurilor ADN la nivel sistemic în modele de șoarece BALB/c cu MM indus

Pentru fiecare compoziție destinată bioprintării s-a utilizat o cultură celulară MC3T3-E1 cultivată într-un flacon de 75 cm² până la atingerea unei confluențe 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

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

suspensiile celulare în tuburi de centrifugă. Centrifugarea s-a realizat la 1300 rpm timp de 3 minute, urmată de eliminarea supernatantului și adăugarea a 200 μ L mediu suplimentat. Determinarea numărului de celule conținut s-a realizat prin adăugarea într-un tub Eppendorf a 10 μ l suspensie celulară alături de 10 μ l colorant Albastru Tripan, din care s-au adăugat 10 μ l în hemocitometru (camera de numărare a celulelor) și numărarea celulelor. S-a ales însămânțarea unei densități celulare de 8×10^6 celule/formulare. Încorporarea celor 200 μ L 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 steril de 3 mL, prevăzut cu un ac metalic steril, protejat de un vârf de micropipetă pentru a reduce riscul contaminării.

II.1.2.5. Bioprintarea 3D în condiții aseptice

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

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 (**figura 1**), înaintea testării fiecărei formulări printabile, pentru a garanta sterilizarea procesului. Bioprintarea 3D s-a realizat direct în plăci cu godeuri sterile, la temperatura de 25°C, pentru care s-au selectat ace sterile cu un diametru interior de 330 μ m. Modelul ales a corespuns unui pătrat cu dimensiunile de 10 \times 10 \times 1 mm (lățime \times lungime \times înălțime; 3 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

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

de printare utilizați sunt ilustrate în **tabelul 2**. Pentru reticularea structurilor bioprintate, s-a ales o strategie de gelifiere ionică, utilizând ioni de Ca^{2+} . Astfel, structurile bioprintate au fost transferate în hota cu flux laminar vertical, unde au fost inițial imersate în soluția de 1% CaCl_2 timp de 5 minute și apoi în α -MEM suplimentat cu o concentrație de 10 mM CaCl_2 , unde au fost lăsate la incubat în condiții standard pentru 24 de ore.

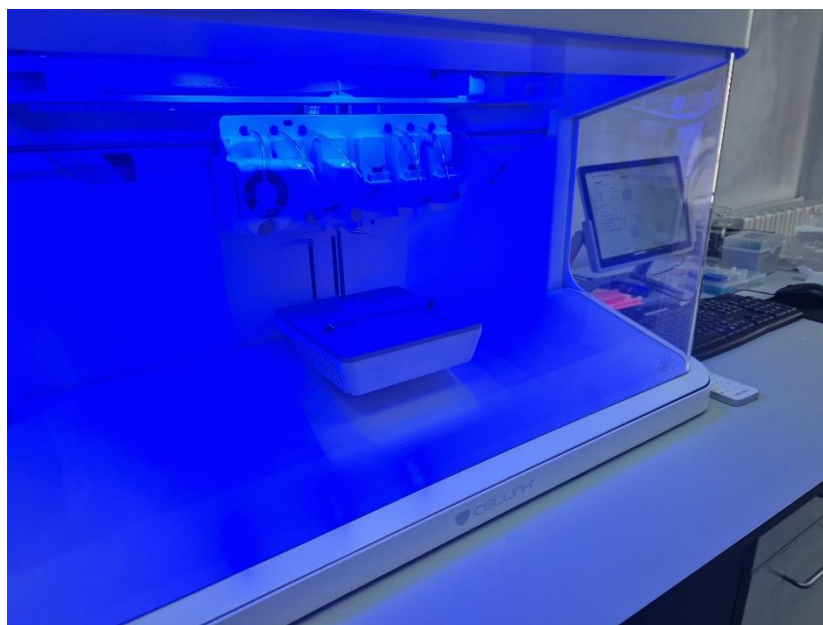


Figura 1. Sterilizarea bioimprimantei 3D BIO X6 înainte de bioprintarea formulărilor

II.1.2.6. Testarea viabilității celulare prin marcarea fluorescență Live/Dead

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

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

Viabilitatea celulară a fost evaluată după 1, 2 și 5 zile de incubare a probelor bioprintate în α -MEM suplimentat cu 10 mM CaCl_2 prin marcarea fluorescență 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, iar soluția Live/Dead a fost preparată prin adăugarea a 15 μL calceină AM și 60 μL etidium homodimer-1 în 30 mL PBS. Din soluția

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

astfel preparată s-au adăugat câte 2 mL în fiecare godeu și s-au incubat plăcile în condiții de întuneric, 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 suplimentat cu 5 mM CaCl₂ în fiecare godeu, pentru a permite vizualizarea probelor marcate cu ajutorul microscopului cu fluorescență Dmi8 (Leica, Germania).

II.1.2.7. Testarea viabilității celulare prin testul cantitativ MTS

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

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

Pentru evaluarea cantitativă a viabilității celulare s-a utilizat testul MTS la 1, 2 și 5 zile după incubare. Mediul de cultură a fost îndepărtat din fiecare godeu și pentru fiecare probă s-au adăugat câte 2 mL soluție MTS de concentrație 20% în mediu de cultură. După incubarea probelor cu MTS timp de o oră în condiții standard, s-au realizat măsurători la spectrofotometrul DeNovix (Wilmington, DE, SUA) pentru determinarea densității optice (O.D.) la lungimea de undă de 490 nm. Rezultatele au fost obținute în triplicat pentru fiecare probă și au fost exprimate ca medie ± deviație standard (SD).

II.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

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

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

II.1.3.1. Evaluarea printabilității formulărilor polimerice acelulare

Printabilitatea formulărilor polimerice pe bază de alginat, K-caragenan și 1% spirulină, cu concentrații diferite de alginat (3 și 4%), K-caragenan (1 și 2%) și CaCl₂ în etapa 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

pregelifiere (0.125 și 0.250%), dar și cu rapoarte masice variate între cei doi polimeri (1:1 și 2:1), a fost evaluată din punct de vedere calitativ, analizând atât morfologia filamentului depus, cât și capacitatea de menținere a fidelității geometrice după depunerea materialului într-unul și 5 straturi (**figura 2**).

În cazul formulărilor printabile pentru care s-a utilizat o concentrație de 0.125% CaCl₂ în etapa de pregelifiere a alginatului, se observă că sistemele care conțin 2% K-caragenan (3A2K11, 3A2K21, 4A2K11, 4A2K21) prezintă o fidelitate superioară a formei la printare, comparativ cu cele care conțin 1% K-caragenan. Acestea generează un filament mai omogen și mai uniform, indicând o printabilitate îmbunătățită, atât pentru formulările cu 3% alginat, cât și pentru cele cu 4%. Nu se evidențiază diferențe semnificative de printabilitate între concentrațiile de 3% și 4% alginat, sugerând că parametrul determinant în acest sistem este reprezentat de concentrația de K-caragenan, în concordanță cu observațiile anterioare. Dintre toate formulările printabile cu conținut de 0.125% CaCl₂ evaluate, materialul 4A2K21 a demonstrat cea mai bună performanță de printare, fiind considerat optim din punct de vedere al menținerii fidelității formei odată cu creșterea numărului de straturi depuse. Acesta se caracterizează printr-un filament continuu, omogen și uniform după extrudarea și depunerea pe suportul de printare. Performanța sa poate fi atribuită unui echilibru adecvat între proprietățile reologice necesare procesului de extrudare și stabilitatea structurală necesară păstrării formei printate, inclusiv în condițiile adăugării unei concentrații de 1.0% (m/v) spirulină în compoziție.

În cazul formulărilor cu un conținut de 0.250% CaCl₂ utilizat în etapa de pregelifiere a alginatului, au fost selectate pentru procesul de printare 3D exclusiv materialele bazate pe o concentrație de 4% alginat, conform rezultatelor obținute anterior. Această alegere se justifică prin capacitatea crescută a alginatului, la această concentrație, de a forma o rețea polimerică suficient de stabilă în prezența ionilor de Ca²⁺, ceea ce conduce la îmbunătățirea proprietăților mecanice și a fidelității structurale a filamentelor extrudate.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

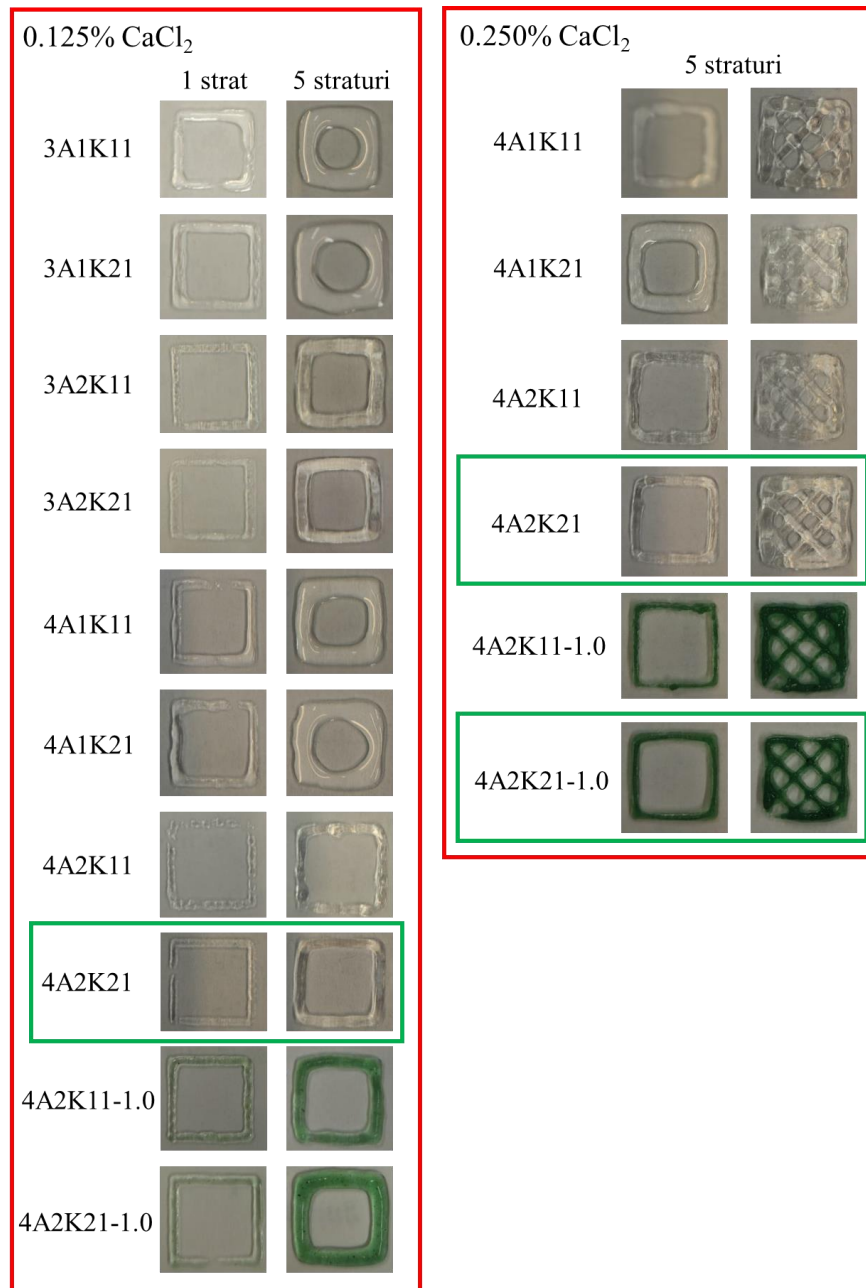


Figura 2. Evaluarea calitativă a printabilității formulărilor polimerice aceluare depuse pe lame de sticlă în 1 și 5 straturi

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

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, se observă menținerea aceluiași trend de îmbunătățire a printabilității odată cu creșterea concentrației de K-caragenan de la 1% la 2%; acest comportament poate fi explicat prin contribuția K-caragenanului la creșterea vâscozității și la formarea unei structuri gelificate suplimentare prin interacțiuni intermoleculare, care stabilizează matricea hidrogelului în timpul extrudării. Raportul optim dintre alginat și K-caragenan s-a confirmat a fi de 2:1, ceea ce sugerează un echilibru favorabil între proprietățile reologice ale alginatului și cele ale K-caragenanului. Acest raport permite obținerea unui material cu comportament pseudoplastic adecvat, caracterizat prin scăderea vâscozității la forfecare și recuperarea rapidă a structurii după extrudare. Adăugarea unei concentrații de 1% spirulină a condus la o creștere suplimentară a printabilității, probabil datorită creșterii vâscozității și a interacțiunilor dintre particulele de spirulină și matricea polimerică. În plus, prezența spirulinei poate acționa ca agent de umplere, contribuind la rigidizarea structurii și la îmbunătățirea stabilității formelor printate.

II.1.3.2. Bioprintarea formulărilor pe bază de alginat, K-caragenan, spirulină și celule MC3T3-E1

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

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

Compozițiile pe bază de alginat, K-caragenan și spirulină au fost testate anterior pentru validarea proprietăților reologice și a fidelității formei la printare. Rezultatele obținute au validat compatibilitatea pentru utilizarea acestora în aplicații de bioprintare 3D. Formulările 4A2K21, 4A2K21-0.5, 4A2K21-1.0 au fost încărcate în cartușe de printare după adăugarea celulelor în compoziție. În **figura 3 a)** se pot observa cartușele conținând formulările printabile cu celule, care au fost montate în bioimprimanta 3D BIO X6 (**figura 3 b)**).

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

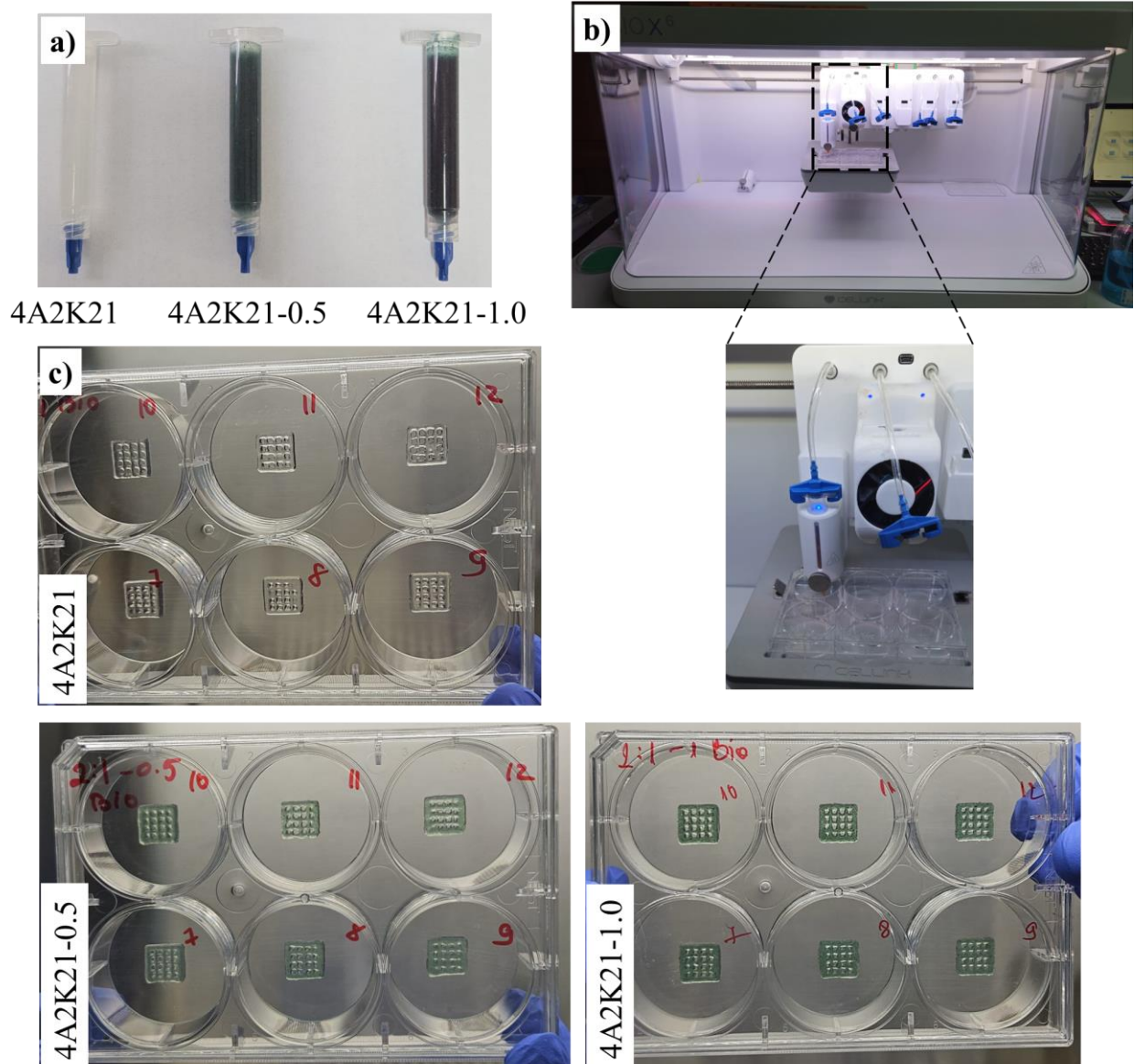


Figura 3. Bioprintarea formulărilor pe bază de alginat, K-caragenan, spirulină și celule MC3T3-E1. **a)** Cartușele conținând cele trei formulări însămânțate cu celule; **b)** Procesul de bioprintare a formulării în placă cu godeuri sterile; **c)** Probele bioprintate cu cele trei formulări.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

În cazul formulării control (4A2K21), în timpul procesului de bioprintare la temperatura de 25°C, viteza s-a păstrat constantă la 7 mm s⁻¹, iar presiunea de extrudare a oscilat între 60 – 85 kPa, pentru determinarea parametrilor optimi. Se observă o ușoară tendință de colapsare a straturilor printate (**figura 3 c**), cel mai probabil din cauza fluidității crescute a materialului induse de temperatura de printare de 25°C, dar cu toate acestea, s-a păstrat morfologia porilor formați la intersecția filamentelor. În continuare, aceleași observații s-au remarcat și în cazul formulărilor 4A2K21-0.5 și 4A2K21-1.0, pentru care s-a impus utilizarea unor presiuni ușor mai ridicate comparativ cu proba control (75 – 80, respectiv 75 – 100 kPa), viteza de printare variind între 6.5 – 7 mm s⁻¹. Acest lucru poate fi corelat cu creșterea vâscozității formulărilor odată cu adaosul de spirulină. Spirulina, prin conținutul său ridicat de proteine, polizaharide și alte molecule bioactive, determină intensificarea interacțiunilor intermoleculare în cadrul matricei polimerice, conducând la formarea unei structuri mai dense și mai rezistente la curgere.

II.1.3.3. Analiza calitativă a viabilității celulare prin marcarea fluorescentă Live/Dead

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

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

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

Evaluarea viabilității celulare a celor 3 seturi de formulări prin marcarea fluorescentă Live/Dead s-a realizat la 1, 2 și 5 zile de incubare după bioprintare, după ce mediul de cultură a fost schimbat la 2 zile pentru menținerea viabilității celulare. Imaginile optice obținute sunt prezentate în **Figura 4**.

Imaginile de microscopie fluorescentă Live/Dead captate la o zi de incubare evidențiază diferențe semnificative între proba control (4A2K21) și formulările cu adaos de spirulină, 4A2K21-0.5 și 4A2K21-1.0. În cazul probei 4A2K21, se observă un număr mai mare de celule viabile, distribuite relativ uniform, alături de un număr redus de celule neviabile, ceea ce indică

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

o viabilitate celulară ridicată. În schimb, pentru probele 4A2K21-0.5 și 4A2K21-1.0 se remarcă o scădere accentuată a numărului de celule vii, fiind foarte evidentă densitatea celulară redusă, sugerând o viabilitate celulară mai scăzută.

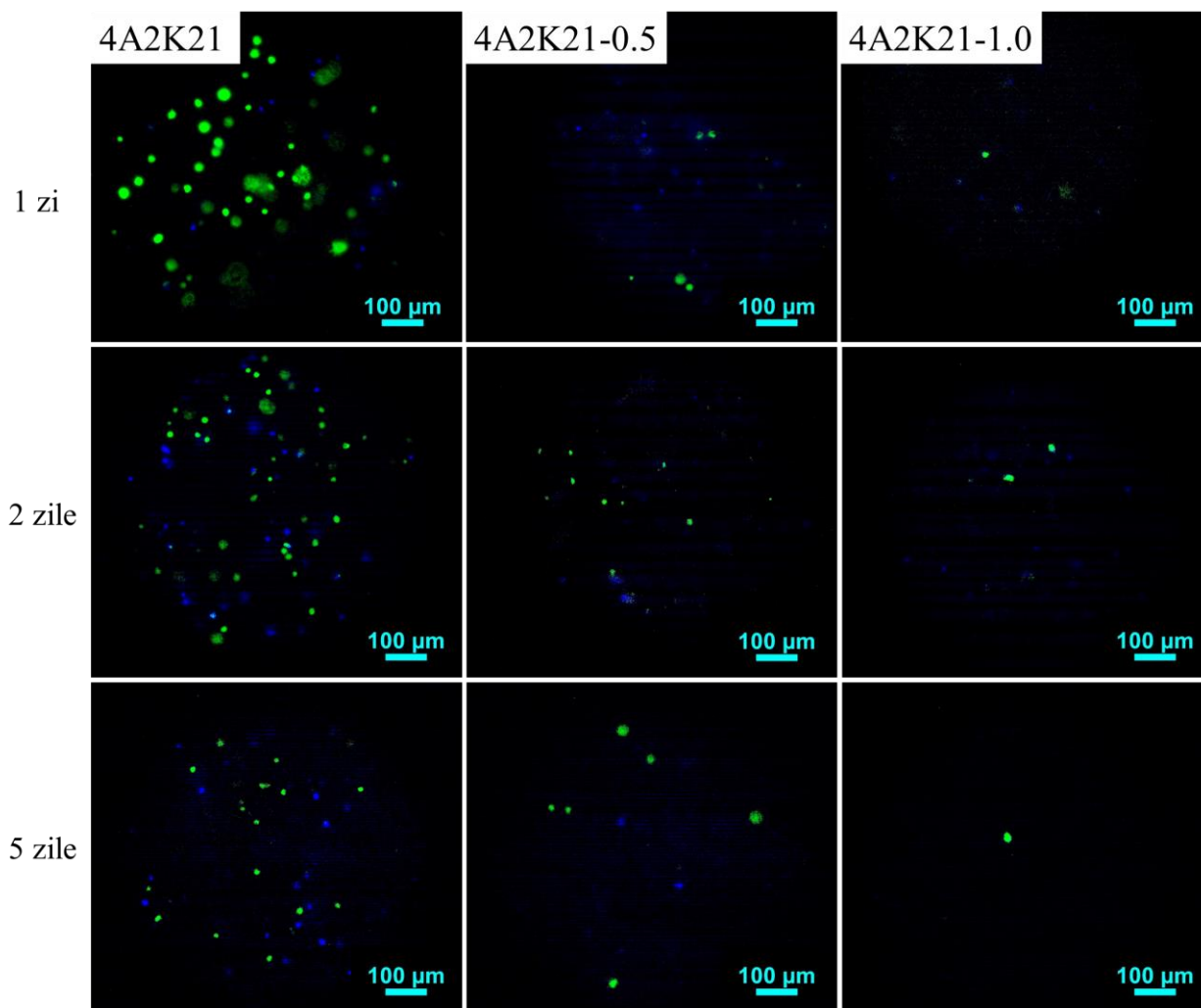


Figura 4. Imaginile de microscopie de fluorescență obținute la 1, 2 și 5 zile de incubare, prin marcarea Live/Dead a probelor pe bază de alginat, K-caragenan, spirulină și celule osteoblaste MC3T3-E1 (verde - celule vii; albastru – celule moarte; scala de 100μm).

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

După 2 zile de incubare, în proba 4A2K21 se menține o populație celulară relativ densă, dar crește ușor proporția celulelor moarte. În formulările cu spirulină, distribuția celulelor vii devine mai uniformă, iar semnalul albastru (celule moarte) rămâne redus, sugerând o bună menținere a viabilității. La 5 zile de incubare, proba 4A2K21 prezintă în continuare un număr mare de celule viabile, însă cu o creștere evidentă a celulelor moarte. În contrast, probele cu spirulină, în special 4A2K21-1.0, indică o viabilitate celulară mai bună pe termen lung, chiar dacă densitatea totală este mai mică, ceea ce sugerează un posibil efect protector sau favorabil al spirulinei asupra supraviețuirii celulare.

În ansamblu, aceste rezultate sugerează că adaosul de spirulină contribuie la menținerea viabilității celulare pe termen mai lung, chiar dacă este asociat cu o densitate celulară inițială mai redusă.

II.1.3.4. Analiza cantitativă a viabilității celulare prin testul MTS

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

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

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

Testul MTS reprezintă o metodă colorimetrică utilizată pentru evaluarea viabilității celulare și a activității metabolice. Acesta se bazează pe capacitatea celulelor vii de a reduce compusul tetrazolic MTS într-un produs colorat, numit formazan, solubil în mediul de cultură. Graficele prezentate în **Figura 5** evidențiază evoluția viabilității celulare testate la 1, 2 și 5 zile de incubare a probelor 4A2K21, 4A2K21-0.5 și 4A2K21-1.0 fără celule (bare albastre) și a celor cu conținut de celule MC3T3-E1 (bare verzi), determinată prin testul MTS, confirmând specificitatea metodei pentru evaluarea activității metabolice.

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

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

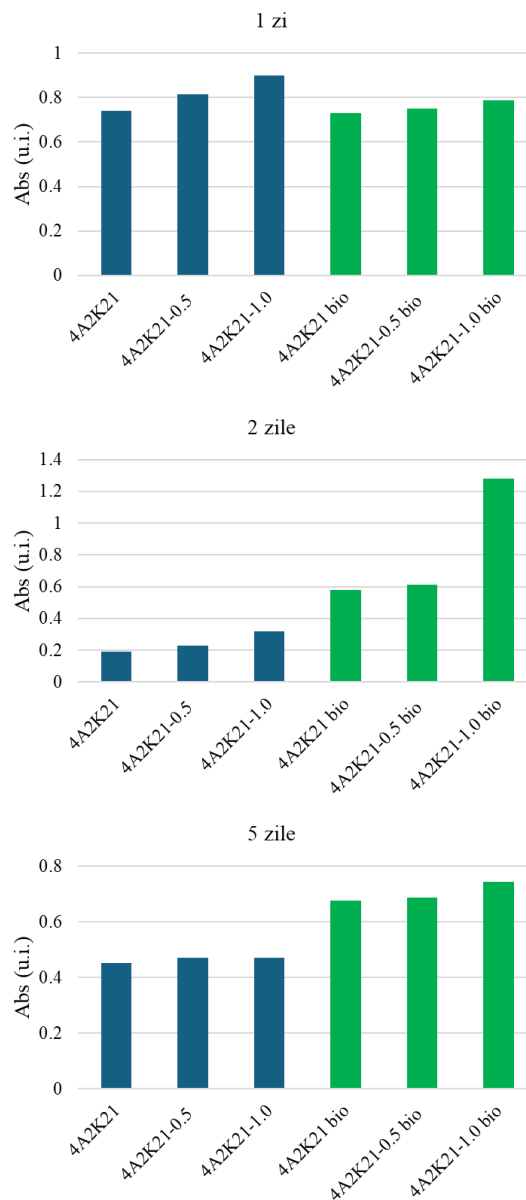
Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

Valorile obținute reflectă activitatea metabolică celulară, fiind direct proporționale cu numărul de celule viabile. Se observă o tendință de creștere a viabilității în timp pentru toate probele, mai pronunțată în cazul formulărilor cu spirulina.



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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

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. Evaluarea cantitativă a viabilității celulare prin testul MTS pentru probele 4A2K21, 4A2K21-0.5 și 4A2K21-1.0 fără celule (albastru) și cu celule MC3T3-E1 (verde – conțin termenul ”bio” în denumire), la 1, 2 și 5 zile.

În cazul probelor fără conținut de celule, se observă valori reduse ale semnalului MTS la toate intervalele de timp analizate, cu o ușoară creștere în timp. Această variație poate fi atribuită interferențelor minore ale materialului sau compușilor din compoziție cu reactivul MTS, însă valorile rămân semnificativ mai mici comparativ cu probele care conțin celule.

Pentru probele cu conținut de celule, se remarcă o creștere evidentă a viabilității celulare în timp, de la ziua 1 până la ziua 5, ceea ce indică proliferarea și adaptarea celulelor în matrice. Comparativ cu proba control 4A2K21, formulările cu spirulină (4A2K21-0.5 și 4A2K21-1.0) prezintă valori mai ridicate ale absorbției MTS, în special la 2 și 5 zile de incubare, sugerând un efect benefic al spirulinei asupra activității metabolice celulare.

De asemenea, se observă o diferență între cele două concentrații de spirulină, proba 4A2K21-1.0 înregistrând cele mai mari valori ale semnalului MTS la 2 zile de incubare, ceea ce indică un posibil efect dependent de concentrație. În ansamblu, rezultatele confirmă că adaosul de spirulină nu doar susține viabilitatea celulară, ci poate stimula activitatea metabolică și proliferarea pe termen mediu.

II.1.4. Concluzii

Prezentul studiu a avut ca obiectiv dezvoltarea, optimizarea și evaluarea unor formulări printabile acelulare și celulare, cu conținut de celule osteoblaste MC3T3-E1, destinate (bio)printării 3D, având în vedere atât proprietățile reologice și caracteristicile de fidelitate la printare, cât și menținerea viabilității celulare post-printare. Prin investigarea mai multor compoziții polimerice, bazate pe combinația dintre alginat, K-caragenan și spirulină în diverse concentrații și rapoarte dintre polimeri, studiul evidențiază provocările asociate (bio)printării

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

3D și importanța echilibrului dintre proprietățile fizico-chimice ale materialelor și compatibilitatea biologică.

Rezultatele microscopiei de fluorescență Live/Dead au evidențiat faptul că formulările cu spirulina (4A2K21-0.5 și 4A2K21-1.0) au menținut o viabilitate mai stabilă pe termen lung, cu mai puține celule moarte. Astfel, spirulina tinde să aibă un efect benefic asupra supraviețuirii celulare, mai degrabă decât asupra proliferării inițiale. De asemenea, rezultatele testului cantitativ MTS au arătat o creștere a viabilității și activității metabolice celulare în timp pentru toate probele, mai pronunțată în formulările cu spirulina, care prezintă valori superioare față de proba control 4A2K21, sugerând un efect stimulator dependent de concentrație asupra proliferării și metabolismului celular.

Bibliografie

- [1] F. Damiri, A. Fatimi, Y. Liu, A. M. Musuc, A. R. Fajardo, B. H. J. Gawda, L. K. Vora, A. Shavandi, O. V. Okoro. Recent advances in 3D bioprinted polysaccharide hydrogels for biomedical applications: A comprehensive review, *Carbohydrate Polymers* 348, part B, 2025, 122845, [10.1016/j.carbpol.2024.122845](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2024.122845)
- [2] J. Tan, Y. Luo, Y. Guo, Y. Zhou, X. Liao, D. Li, X. Lai, Y. Liu. Development of alginate-based hydrogels: Crosslinking strategies and biomedical applications, *International Journal of Biological Macromolecules* 239, 2023, 124275, [10.1016/j.ijbiomac.2023.124275](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.124275)
- [3] K. M. Zia, S. Tabasum, M. Nasif, N. Sultan, N. Aslam, A. Noreen, M. Zuber. A review on synthesis, properties and applications of natural polymer based carrageenan blends and composites. *International Journal of Biological Macromolecules* 96, 2017, 282–301, [10.1016/j.ijbiomac.2016.11.095](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.11.095)

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE
POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

[4] K. Bialik-Wąs, A. Kulawik-Pióro, A. Sienkiewicz, A. Łętocha, J. Osińska, K. Malarz, A. Mrozek-Wilczkiewicz, M. Barczewski, A. Lanoue, N. Giglioli-Guivarc'h, M. Miastkowska. Design and development of multibiocomponent hybrid alginate hydrogels and lipid nanodispersion as new materials for medical and cosmetic applications. International Journal of Biological Macromolecules 278(1), 2024, 134405. [10.1016/j.ijbiomac.2024.134405](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.134405)

[5] S. James, M. Moawad. Study on composite hydrogel mixture of calcium alginate/gelatin/kappa carrageenan for 3D bioprinting, Bioprinting 31, 2023, e00273, [10.1016/j.bprint.2023.e00273](https://doi.org/10.1016/j.bprint.2023.e00273)

[6] D. M. C. Marques, J. C. Silva, A. P. Serro, J. M. S. Cabral, P. Sanjuan-Alberte, F. C. Ferreira. 3D bioprinting of novel κ -carrageenan bioinks: An algae-derived polysaccharide, Bioengineering 9 (3), 2022, 109, [10.3390/bioengineering9030109](https://doi.org/10.3390/bioengineering9030109)

[7] S. Tharakan, S. Khondkar, S. Lee, S. Ahn, C. Mathew, A. Gresita, M. Hadjiargyrou, A. Ilyas. 3D Printed Osteoblast–Alginate/Collagen Hydrogels Promote Survival, Proliferation and Mineralization at Low Doses of Strontium Calcium Polyphosphate, Pharmaceutics 15(1), 2022, 11, [10.3390/pharmaceutics15010011](https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15010011)

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

II.2. Captiolul 2

II.2. Inițierea culturilor celulare pentru liniile RPMI 8226, hMSC-BM și MC3T3-E1

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

Subactivitatea 3.1. Validarea substituenților osoși în modele de șoarece.

II.2.1. Introducere

Din cauza unor defecțiuni tehnice apărute la nivelul sistemului de stocare criogenică, a fost necesară dezghețarea tuturor liniilor celulare stocate și reluarea procesului de cultivare a acestora în condiții standard de cultură. Scopul acestei etape a fost asigurarea proliferării celulare până la atingerea unei densități adecvate pentru reinițierea procedurilor de crioconservare, în vederea restabilirii stocurilor de lucru. În consecință, toate etapele experimentale asociate manipulării și întreținerii liniilor celulare au fost reluate, incluzând dezghețarea, însămânțarea, cultivarea în medii specifice și monitorizarea proliferării celulare. Aceste proceduri au fost realizate conform protocoalelor standard utilizate anterior.

Culturile celulare constituie un instrument fundamental în cercetarea biomedicală, iar inițierea și menținerea acestora implică o serie de proceduri experimentale care trebuie realizate în condiții strict controlate. Integritatea și stabilitatea culturilor depind în mare măsură de aplicarea riguroasă a tehnicilor de lucru aseptice, menite să prevină contaminarea microbiologică cu bacterii, fungi sau micoplasme. Astfel de contaminări pot compromite viabilitatea celulară, pot induce modificări fenotipice și pot afecta semnificativ reproductibilitatea rezultatelor experimentale. În acest context, manipularea materialelor în hotă cu flux laminar, utilizarea echipamentelor sterile și monitorizarea constantă a condițiilor de cultură reprezintă elemente esențiale pentru menținerea unor culturi celulare stabile și biologic relevante [1], [2].

În studiul de față au fost utilizate mai multe tipuri de linii celulare, selectate datorită relevanței lor pentru modelele experimentale investigate. Linia celulară MC3T3-E1,

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

reprezentând preosteoblaste murine, este frecvent utilizată în studiile privind osteogeneza și metabolismul osos și, fiind o linie aderentă, necesită manipulare atentă pentru menținerea morfologiei, viabilității și capacității de diferențiere osteogenică [3]. De asemenea, au fost utilizate celule stem mezenchimale derivate din măduva osoasă umană (hMSC-BM), caracterizate prin potențial multipotent de diferențiere, dar sensibile la variațiile condițiilor de cultură și la contaminare, ceea ce impune aplicarea unor proceduri experimentale riguroase [4]. În plus, a fost inclusă linia celulară RPMI 8226, derivată din plasmocite tumorale umane și utilizată pe scară largă ca model experimental pentru studiul mielomului multiplu, care prezintă creștere în suspensie și necesită condiții de cultură atent controlate pentru menținerea viabilității și a caracteristicilor fenotipice specifice [5].

II.2.2. Materiale și metode

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

Subactivitatea 3.1. Validarea substituenților osoși în modele de șoarece.

Liniile celulare MC3T3-E1, RPMI 8226 și hMSC-BM au fost achiziționate de la Cytion (GmbH, Heidelberg, Germania). Celulele MC3T3-E1 au fost cultivate în mediu α -MEM suplimentat cu ribonucleozide și deoxiribonucleozide (Sigma-Aldrich Merck, Darmstadt, Germania), completat cu 10% ser fetal bovin (FBS; Gibco™, Thermo Fisher Scientific) și 1% soluție penicilină–streptomicină (P-S; Gibco™, Thermo Fisher Scientific). Celulele hMSC-BM au fost menținute în mediu α -MEM fără ribonucleozide și deoxiribonucleozide (Sigma-Aldrich Merck, Darmstadt, Germania), suplimentat cu 10% FBS, 1% soluție P-S și 0.1 μ g/mL fibroblast growth factor (bFGF; Sigma-Aldrich Merck, Darmstadt, Germania). Linia celulară RPMI 8226 a fost cultivată în mediu RPMI-1640 cu glutamină (Cytion, Darmstadt, Germania), suplimentat cu 10% FBS și 1% soluție P-S. Soluțiile de tampon fosfat salin (PBS) și dimetilsulfoxid (DMSO) au fost furnizate de Sigma-Aldrich Merck (Darmstadt, Germania), iar tripsina a fost achiziționată de la Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, SUA).

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

II.2.3. Dezghețarea și inițierea liniilor celulare

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

Subactivitatea 3.1. Validarea substituenților osoși în modele de șoarece.

II.2.3.1. Dezghețarea liniei celulare MC3T3-E1

Linia celulară MC3T3-E1 a fost reinițiată în cultură utilizând mediu α -MEM suplimentat cu ribonucleozide și deoxiribonucleozide, 10% FBS și 1% P-S. Criotuburile conținând celulele a fost dezghețate rapid într-o baie cu bile metalice la 37°C, dezinfectat extern cu etanol 70% și transferat în hota cu flux laminar. Suspensia celulară a fost omogenizată prin pipetare ușoară, iar întregul volum din criotuburi (1,5 mL) a fost transferat într-un tub de centrifugare de 15 mL conținând 8 mL de mediu complet, pentru diluarea agentului crioprotector. Ulterior, suspensia a fost centrifugată la 1300 rpm timp de 3 minute, supernatantul a fost îndepărtat, iar sedimentul celular a fost resuspendat în 1 mL de mediu complet. Celulele din fiecare criotub au fost apoi însămânțate în câte două flask-uri T75 pentru culturi aderente și incubate în condiții standard (37°C, 5% CO₂), pentru a permite aderarea și proliferarea celulelor preosteoblastice.

II.2.3.2. Dezghețarea și inițierea liniei celulare hMSC-BM

În cazul celulelor stem hMSC-BM cultivarea s-a realizat utilizând mediu α -MEM fără ribonucleozide și deoxiribonucleozide, suplimentat cu 10% FBS, 1% P-S și 0.1 μ g/mL bFGF. Criotuburile conținând celulele a fost dezghețate rapid la 37°C, dezinfectate extern cu etanol 70% și transferate în hota cu flux laminar. Suspensia celulară a fost omogenizată prin pipetare ușoară, iar volumul de 1,5 mL a fost transferat într-un tub de centrifugare de 15 mL conținând 8 mL de mediu complet, pentru diluarea agentului crioprotector. Suspensia celulară a fost centrifugată la 1300 rpm timp de 3 minute, după care supernatantul a fost îndepărtat, iar sedimentul celular a fost resuspendat în 1 mL de mediu complet. Celulele din fiecare criotub

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

au fost apoi distribuite în două flask-uri T75 pentru culturi aderente, conținând mediu complet preîncălzit, și incubate în condiții standard (37°C, 5% CO₂) pentru a permite aderarea celulară și menținerea proprietăților biologice caracteristice celulelor stem mezenchimale.

II.2.3.3. Dezghețarea și inițierea liniei celulare RPMI 8226

Linia celulară RPMI 8226 a fost inițiată în cultură utilizând mediu RPMI 1640 complet, suplimentat cu 10% FBS și 1% P-S. Criotuburile conținând celulele a fost dezghețate într-o baie cu bile metalice la 37°C, dezinfectate și transferate în hota cu flux laminar pentru manipulare aseptică. Suspensia celulară a fost omogenizată, iar volumul criotubului a fost transferat în tuburi de centrifugare conținând 8 mL de mediu RPMI 1640 complet. Suspensia celulară a fost centrifugată la 1300 rpm timp de 3 minute pentru sedimentarea celulelor și eliminarea agentului crioprotector. După îndepărtarea supernatantului, sedimentul celular a fost resuspendat în 1 mL de mediu complet proaspăt, iar celulele au fost transferate într-un flask T25 destinat culturilor în suspensie, conținând mediu RPMI 1640 complet. Cultura a fost incubată în condiții standard pentru reluarea proliferării celulare.

II.2.4. Pasajul celular

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

Subactivitatea 3.1. Validarea substituenților osoși în modele de șoarece.

II.2.4.1. Pasajul celular MC3T3-E1

Subcultivarea liniei MC3T3-E1 a fost efectuată în condiții strict aseptice, utilizând mediu α -MEM complet suplimentat. Toate etapele au fost realizate în hotă cu flux laminar, iar culturile au fost menținute în incubator la 37°C, într-o atmosferă umidificată cu 5% CO₂, pentru a asigura condiții fiziologice optime. La atingerea confluenței, mediul a fost îndepărtat, iar monostratul celular a fost spălat cu PBS pentru eliminarea reziduurilor de ser și a metaboliților care pot interfera cu activitatea enzimatică. Ulterior, s-a adăugat soluție de tripsină, iar celulele

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

au fost incubate scurt la 37°C până la detașarea completă de pe suprafața de cultură. Reacția enzimatică a fost neutralizată prin adăugarea de mediu complet, iar suspensia celulară a fost resuspendată pentru obținerea unei distribuții omogene. Celulele au fost apoi redistribuite în recipiente noi, conținând mediu proaspăt, și incubate în condiții standard pentru reatașare și proliferare. Mediul a fost înlocuit la intervale de 2–3 zile pentru menținerea viabilității și a funcționalității celulare. Procedura de pasaj a fost repetată la fiecare confluență, până la obținerea de 24 de flask-uri de 75 cm².

II.2.4.2. Pasajul celular hMSC-BM

Subcultivarea celulelor hMSC-BM a fost realizată în condiții strict aseptice, utilizând mediu α -MEM fără ribonucleozide și deoxiribonucleozide, suplimentat corespunzător. La atingerea confluenței, mediul a fost îndepărtat, iar monostratul celular a fost spălat cu PBS pentru eliminarea reziduurilor de ser și a componentelor care pot interfera cu procesul enzimatic. Detașarea celulară a fost realizată prin incubare cu tripsină la 37°C, iar reacția a fost oprită prin adăugarea de mediu complet. Suspensia celulară a fost colectată în tuburi de centrifugare și procesată prin centrifugare la 1300 rpm timp de 3 minute pentru sedimentare. Supernatantul a fost îndepărtat, iar celulele au fost resuspendate în mediu proaspăt. Culturile au fost incubate în condiții standard pentru reatașare și proliferare, iar mediul a fost schimbat la intervale de 2–3 zile pentru menținerea viabilității și a funcționalității celulare, în vederea utilizării ulterioare în experimente. Etapele pasajului celular s-au repetat atunci când cultura a ajuns la confluență până la atingerea unui număr de 16 flask-uri de 75 cm².

II.2.4.3. Pasajul celular RPMI 8226

Subcultivarea liniei celulare RPMI 8226, o linie tumorală umană cu creștere în suspensie, a fost realizată utilizând mediu RPMI 1640 complet suplimentat, în condiții strict

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

aseptice. Întregul volum de cultură a fost transferat într-un tuburi de centrifugare și procesat prin centrifugare la 1300 rpm timp de 3 minute, pentru sedimentarea celulelor și separarea acestora de mediul uzat. După îndepărtarea supernatantului, sedimentul celular a fost resuspendat în 1 mL de mediu proaspăt, obținându-se o suspensie omogenă. Concentrațiile inițiale au fost diluate pentru a asigura proliferarea celulară. Culturile au fost menținute la 37°C, iar mediul a fost schimbat la intervale de 2–3 zile pentru menținerea unui microambient adecvat proliferării și stabilizării celulare înaintea experimentelor ulterioare. Pasajul celular a fost repetat de fiecare dată când celulele au ajuns la confluență până la obținerea de 10 de flask-uri de 25 cm².

II.2.5. Înghețarea culturilor celulare

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

Subactivitatea 3.1. Validarea substituenților osoși în modele de șoarece.

II.2.5.1. Înghețarea culturii celulare MC3T3-E1

Crioconservarea celulelor a fost realizată în condiții strict aseptice, sub hotă cu flux laminar vertical. Înainte de inițierea procedurii, au fost pregătite și etichetate corespunzător criotuburile necesare, indicând linia celulară, data și numărul pasajului. Pentru fiecare flask de 75 cm² au fost alocate două criotuburi. Mediul de crioconservare a fost preparat prin suplimentarea mediului complet α -MEM cu 10% DMSO, iar volumul total a fost calculat în funcție de numărul de flask-uri procesate (24 de flask-uri T75). Celulele au fost detașate prin îndepărtarea mediului de cultură, urmată de două spălări succesive cu PBS și tratament cu tripsină până la desprinderea completă. Reacția enzimatică a fost oprită prin adăugarea de mediu complet, iar suspensia celulară a fost colectată și centrifugată la 1300 rpm timp de 3 minute. După îndepărtarea supernatantului, pelletul celular a fost resuspendat în mediul de crioconservare, utilizându-se 1,5 mL per criotub, rezultând un total de 48 de criotuburi. Suspensia a fost omogenizată cu atenție, distribuită în criotuburi, iar acestea au fost dezinfectate

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

extern și transferate la -80°C pentru depozitare conform protocolului standard de crioconservare.

II.2.5.2. Înghețarea culturii celulare hMSC-BM

Crioconservarea celulelor hMSC-BM a fost realizată în condiții aseptice, sub hotă cu flux laminar. Pentru fiecare flask de 75 cm^2 au fost alocate două criotuburi. Mediul de crioconservare a fost preparat prin suplimentarea unui amestec conținând 80% FBS, 9% α -MEM, 1% P-S și 10% DMSO. Celulele au fost detașate prin îndepărtarea mediului de cultură, urmată de spălări cu PBS și tratament cu tripsină până la desprinderea completă. Activitatea enzimatică a fost neutralizată prin adăugarea de mediu complet, iar suspensia celulară a fost colectată și centrifugată la 1300 rpm timp de 3 minute. După îndepărtarea supernatantului, pelletul celular a fost resuspendat în mediul de crioconservare, utilizându-se 1,5 mL per criotub, rezultând un total de 32 de criotuburi. Criotuburile au fost dezinfectate extern, poziționate corespunzător și depozitate la -80°C conform protocolului standard de crioconservare

II.2.5.3. Înghețarea culturii celulare RPMI 8226

Crioconservarea liniei celulare RPMI 8226 a fost realizată conform protocolului standard, utilizând mediu suplimentat cu 10% DMSO. Înainte de inițierea procedurii, au fost pregătite și etichetate corespunzător criotuburile necesare. DMSO-ul a fost filtrat steril, iar mediul de crioconservare a fost preparat prin suplimentarea mediului complet RPMI cu 10% DMSO. Pentru fiecare flask de 25 cm^2 au fost alocate două criotuburi, fiind procesate celule provenite din 10 de flask-uri T25. Mediul de cultură a fost îndepărtat, iar celulele au fost colectate și centrifugate la 1300 rpm timp de 3 minute. După eliminarea supernatantului, pelletul celular a fost resuspendat în mediul de crioconservare, utilizându-se 1,5 mL per

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

criotub, rezultând un total de 20 de criotuburi sterile. Criotuburile au fost dezinfectate și depozitate la -80°C conform protocolului standard de crioconservare.

II.2.4. Concluzii

În urma defecțiunilor tehnice apărute la nivelul sistemului de stocare criogenică, a fost necesară reluarea completă a proceselor de decongelare, cultivare, pasaj și crioconservare pentru liniile celulare utilizate în cadrul studiului. Aplicarea riguroasă a protocoalelor standard de cultură celulară și a tehnicilor aseptice a permis restabilirea culturilor viabile, menținerea caracteristicilor fenotipice specifice fiecărei linii celulare și asigurarea condițiilor optime pentru proliferare. Reinițierea și extinderea culturilor pentru liniile MC3T3-E1, hMSC-BM și RPMI 8226 au fost realizate cu succes, prin utilizarea mediilor de cultură adecvate fiecărui tip celular, monitorizarea atentă a parametrilor de incubare și efectuarea pasajelor la confluență. De asemenea, crioconservarea a fost efectuată conform protocoalelor standardizate, utilizând medii specifice fiecărei linii celulare și concentrații controlate de DMSO, ceea ce a condus la obținerea unui număr adecvat de criotuburi pentru fiecare tip celular. Depozitarea la -80°C a fost realizată în condiții corespunzătoare, asigurând menținerea viabilității celulare pe termen lung. În concluzie, activitățile desfășurate au permis restabilirea completă a infrastructurii biologice necesare cercetării, garantând continuitatea experimentală, stabilitatea culturilor celulare și conformitatea cu standardele de bune practici în manipularea și conservarea liniilor celulare.

Bibliografie

- [1] C. Philippeos, R. D. Hughes, A. Dhawan, and R. R. Mitry, “Introduction to Cell Culture,” *Methods in Molecular Biology*, vol. 806, pp. 1–13, 2012, doi: 10.1007/978-1-61779-367-7_1.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE
POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

- [2] C. Pan, C. Kumar, S. Bohl, U. Klingmueller, and M. Mann, “Comparative proteomic phenotyping of cell lines and primary cells to assess preservation of cell type-specific functions,” *Molecular and Cellular Proteomics*, vol. 8, no. 3, pp. 443–450, Mar. 2009, doi: 10.1074/mcp.M800258-MCP200.
- [3] M. Izumiya *et al.*, “Evaluation of MC3T3-E1 Cell Osteogenesis in Different Cell Culture Media,” *International Journal of Molecular Sciences* 2021, Vol. 22, Page 7752, vol. 22, no. 14, p. 7752, Jul. 2021, doi: 10.3390/IJMS22147752.
- [4] V. Ribeiro, M. Garcia, R. Oliveira, P. S. Gomes, B. Colaço, and M. H. Fernandes, “Bisphosphonates induce the osteogenic gene expression in co-cultured human endothelial and mesenchymal stem cells,” *J. Cell. Mol. Med.*, vol. 18, no. 1, pp. 27–37, Jan. 2014, doi: 10.1111/jcmm.12154.
- [5] Y. Wang, S. Wu, X. Zhao, Z. Su, L. Du, and A. Sui, “In vitro toxicity evaluation of graphene oxide on human RPMI 8226 cells,” *Biomed. Mater. Eng.*, vol. 24, no. 6, pp. 2007–2013, 2014, doi: 10.3233/BME-141010.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

II.3. Capitolul 3

Sinteza gelatinei metacrilate

Activitatea 3. Validarea in vivo a eficienței dispozitivelor REOSTEOMi.

Subactivitatea 3.1. Validarea substituenților osoși în modele de șoarece.

II.3.1. Introducere

Hidrogelurile reprezintă o clasă de biomateriale frecvent investigate în ingineria tisulară datorită capacității lor de a reproduce anumite caracteristici esențiale ale mediului tridimensional al matricei extracelulare. Structura lor, caracterizată printr-un conținut ridicat de apă și o rețea polimerică poroasă, permite difuzia nutrienților și a produselor metabolice, precum și încapsularea și susținerea celulelor în interiorul materialului. Pentru integrarea în aplicații biomedicale, aceste sisteme trebuie proiectate astfel încât să îndeplinească cerințe riguroase legate de biocompatibilitate, stabilitate în mediul fiziologic, proprietăți mecanice adecvate și un profil de degradare controlat. Ajustarea acestor parametri este necesară pentru a corespunde particularităților structurale și funcționale ale diferitelor tipuri de țesut [1], [2].

Gelatina este un biopolimer derivat din colagen, obținut prin hidroliza parțială a acestuia, care păstrează o parte din secvențele bioactive responsabile de interacțiunea cu celulele. Datorită originii sale naturale, biodegradabilității și prezenței motivelor de adeziune celulară, gelatina a fost utilizată pe scară largă în ingineria tisulară ca material pentru formarea de hidrogeluri. Structura sa proteică permite absorbția unor cantități mari de apă și formarea unor rețele tridimensionale poroase, favorabile difuziei nutrienților și transportului produselor metabolice. Cu toate acestea, hidrogelurile de gelatină formate exclusiv prin gelificare termică prezintă o stabilitate limitată la temperatura fiziologică, deoarece tranziția sol-gel este

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

reversibilă și structura rețelei polimerice se destabilizează la aproximativ 37 °C, ceea ce restricționează utilizarea lor în aplicații biomedicale pe termen lung [3], [4].

Pentru a depăși aceste limitări, gelatina poate fi modificată chimic prin introducerea unor grupări funcționale capabile de reticulare covalentă. Metacrilarea gelatinei reprezintă una dintre cele mai utilizate strategii, fiind realizată prin reacția grupărilor amino și hidroxil prezente în structura proteinei cu anhidridă metacrilică. Produsul rezultat, gelatina metacrilată (GelMA), este un polimer fotosensibil care poate forma hidrogeluri stabile prin fotopolimerizare în prezența unor fotoinițiatori. Această metodă permite formarea rapidă a unei rețele polimerice covalente și oferă un control precis asupra proprietăților structurale ale hidrogelurilor obținute [5], [6].

Proprietățile hidrogelurilor GelMA pot fi ajustate prin variația gradului de metacrilare, a concentrației polimerului și a condițiilor de fotopolimerizare. Modificarea acestor parametri influențează densitatea de reticulare, rigiditatea mecanică, dimensiunea porilor și comportamentul de umflare al rețelei polimerice. În plus, deoarece structura gelatinei păstrează secvențe bioactive derivate din colagen, hidrogelurile GelMA susțin adeziunea, proliferarea și diferențierea celulară fără necesitatea introducerii unor peptide suplimentare de adeziune. Aceste caracteristici au condus la utilizarea extinsă a GelMA în aplicații de inginerie tisulară, inclusiv în modele de cultură celulară tridimensională, regenerare tisulară și sisteme de livrare controlată a factorilor bioactivi [7].

Literatura de specialitate indică faptul că hidrogelurile GelMA prezintă proprietăți mecanice și biologice care pot fi adaptate pentru diferite tipuri de țesuturi, de la țesuturi moi până la structuri cu cerințe mecanice mai ridicate. Compatibilitatea lor cu tehnologiile de bioprintare 3D permite fabricarea de structuri hidrogelice cu arhitecturi controlate și distribuții spațiale precise ale celulelor. În acest context, sinteza și caracterizarea gelatinei metacrilate reprezintă o etapă importantă în dezvoltarea unor biomateriale hidrogelice avansate, destinate aplicațiilor de inginerie tisulară și medicină regenerativă [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

II.3.2. Materiale și metode

Activitatea 3. Validarea in vivo a eficienței dispozitivelor REOSTEOMi.

Subactivitatea 3.1. Validarea substituenților osoși în modele de șoarece.

II.3.2.1. Materiale utilizate

Gelatină comercială din piele de pește, anhidrida metacrilică (MA), membrane de dializă de 14 kDa și comprimatele cu soluție de tampon fosfat salin (PBS), hidroxidul de sodiu (NaOH) au fost achiziționate de la Sigma-Aldrich.

II.3.3. Sinteza gelatinei metacrilate

Activitatea 3. Validarea in vivo a eficienței dispozitivelor REOSTEOMi.

Subactivitatea 3.1. Validarea substituenților osoși în modele de șoarece.

Sinteza GelMA a fost realizată pentru obținerea unui polimer fotosensibil destinat aplicațiilor de inginerie tisulară. Procedura experimentală a utilizat gelatină comercială ca material de bază, supusă unui proces de metacrilare prin reacția grupărilor amino libere, și într-o măsură mai redusă a grupărilor hidroxil, cu anhidridă metacrilică în condiții alcaline controlate. Această reacție conduce la introducerea grupărilor metacrilat pe lanțurile polipeptidice ale gelatinei, permițând ulterior formarea unei rețele polimerice stabile prin fotopolimerizare în prezența unui fotoinițiator [9], [10]. Metodologia experimentală a fost adaptată pe baza unor protocoale raportate în literatura recentă, cu ajustarea cantităților de reactivi în funcție de condițiile experimentale utilizate în laborator.

În etapa inițială a sintezei, 60 g de gelatină au fost dizolvate în 1200 mL de soluție tampon PBS, utilizând o baie de apă menținută la 50 °C. Procesul de dizolvare a fost realizat pe o durată de 2 ore, până la obținerea unei soluții omogene. Pe parcursul acestei etape, pH-ul sistemului a fost monitorizat constant și ajustat la valoarea 7,4 prin adăugarea controlată a unei soluții de NaOH 5 M, pentru a asigura condițiile adecvate desfășurării ulterioare a reacției de metacrilare. Dizolvarea gelatinei comerciale în soluție tampon fosfat salin la temperatură

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

ridicată a condus la obținerea unei soluții omogene, fără agregate vizibile, indicând o hidratare completă a lanțurilor polimerice. Menținerea pH-ului în intervalul 7,4 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.

După obținerea soluției omogene de gelatină, s-au adăugat treptat, prin picurare, 2,235 mL de anhidridă metacrilică. În timpul acestei etape s-a observat o tendință de scădere a pH-ului, determinată de desfășurarea reacției de metacrilare. Pentru menținerea condițiilor optime de reacție, pH-ul soluției a fost monitorizat și reajustat periodic prin adăugarea unei soluții de NaOH 5 M, astfel încât valoarea acestuia să fie menținută în intervalul 7,4–7,8. Reacția a fost lăsată să se desfășoare timp de 3 ore, sub agitație continuă, conducând la formarea derivatului metacrilat al gelatinei, GelMA.

La finalul reacției, procesul de metacrilare a fost oprit prin adăugarea a 300 mL de soluție PBS. Oprirea reacției prin diluare cu soluție PBS a asigurat neutralizarea mediului și limitarea reacțiilor ulterioare. Soluția rezultată a fost supusă ulterior unui proces de purificare prin dializă, utilizând membrane cu masa moleculară de tăiere de 14 kDa. Dializa s-a desfășurat pe o perioadă de 3 zile în apă distilată, cu înlocuirea mediului la intervale de 24 de ore, pentru îndepărtarea anhidridei metacrilice nereacționate, a sărurilor și a altor compuși reziduali.

După finalizarea etapei de dializă, soluția de GelMA a fost transferată în plăcuțe Petri și congelată, fiind ulterior supusă procesului de liofilizare. Materialul obținut în formă solidă a fost colectat și păstrat pentru utilizare în etapele experimentale 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 GelMA a prezentat un aspect clar, fără miros specific de anhidridă, sugerând o purificare adecvată. Confirmarea structurală a funcționalizării chimice poate fi realizată ulterior prin

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

utilizarea tehnicii de rezonanță magnetică nucleară (RMN), prin evidențierea benzilor caracteristice grupărilor metacrilice.

II.3.4. Concluzii

Gelatina metacrilată a fost obținută prin modificarea chimică a gelatinei comerciale în mediu alcalin, folosind anhidridă metacrilică drept agent de funcționalizare. Menținerea pH-ului în limite controlate și etapa de purificare prin dializă au avut un rol esențial în eliminarea reactivilor reziduali și în obținerea unui produs cu proprietăți chimice corespunzătoare. Materialul rezultat, GelMA, poate fi utilizat ca precursor pentru formarea de hidrogeluri cu capacitate de fotoreticulare și prezintă potențial pentru aplicații în ingineria tisulară, inclusiv în procese de fabricație aditivă.

Bibliografie

- [1] N. A. Peppas, J. Z. Hilt, A. Khademhosseini, and R. Langer, “Hydrogels in biology and medicine: From molecular principles to bionanotechnology,” Jun. 06, 2006. doi: 10.1002/adma.200501612.
- [2] A. S. Hoffman, “Hydrogels for biomedical applications,” Dec. 2012. doi: 10.1016/j.addr.2012.09.010.
- [3] S. Young, M. Wong, Y. Tabata, and A. G. Mikos, “Gelatin as a delivery vehicle for the controlled release of bioactive molecules,” in *Journal of Controlled Release*, Dec. 2005, pp. 256–274. doi: 10.1016/j.jconrel.2005.09.023.
- [4] A. I. Van Den Bulcke, B. Bogdanov, N. De Rooze, E. H. Schacht, M. Cornelissen, and H. Berghmans, “Structural and rheological properties of methacrylamide modified gelatin hydrogels,” *Biomacromolecules*, vol. 1, no. 1, pp. 31–38, 2000, doi: 10.1021/bm990017d.
- [5] J. W. Nichol, S. T. Koshy, H. Bae, C. M. Hwang, S. Yamanlar, and A. Khademhosseini, “Cell-laden microengineered gelatin methacrylate hydrogels,” *Biomaterials*, vol. 31, no. 21, pp. 5536–5544, Jul. 2010, doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.03.064.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE
POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

- [6] K. Yue, G. Trujillo-de Santiago, M. M. Alvarez, A. Tamayol, N. Annabi, and A. Khademhosseini, “Synthesis, properties, and biomedical applications of gelatin methacryloyl (GelMA) hydrogels,” Dec. 01, 2015, *Elsevier Ltd.* doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.08.045.
- [7] J. W. Nichol, S. T. Koshy, H. Bae, C. M. Hwang, S. Yamanlar, and A. Khademhosseini, “Cell-laden microengineered gelatin methacrylate hydrogels,” *Biomaterials*, vol. 31, no. 21, pp. 5536–5544, Jul. 2010, doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.03.064.
- [8] T. Billiet, E. Gevaert, T. De Schryver, M. Cornelissen, and P. Dubruel, “The 3D printing of gelatin methacrylamide cell-laden tissue-engineered constructs with high cell viability,” *Biomaterials*, vol. 35, no. 1, pp. 49–62, 2014, doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.09.078.
- [9] R. N. Ghosh *et al.*, “An insight into synthesis, properties and applications of gelatin methacryloyl hydrogel for 3D bioprinting,” Oct. 19, 2023, *Royal Society of Chemistry.* doi: 10.1039/d3ma00715d.
- [10] E. Kim *et al.*, “Biomimetic composite gelatin methacryloyl hydrogels for improving survival and osteogenesis of human adipose-derived stem cells in 3D microenvironment,” *Mater. Today Bio*, vol. 29, Dec. 2024, doi: 10.1016/j.mtbio.2024.101293.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

PARTEA III

III.1. Capitolul 1

III.1. Pregătirea culturii celulare și evaluarea biocompatibilității structurilor din GelMA, GellanMA și diferite concentrații de GO, prin testare Live/Dead

Activitatea 3. Validarea in vivo a eficienței dispozitivelor REOSTEOMi

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

III.1.1. Introducere

În ingineria tisulară și dezvoltarea biomaterialelor, interacțiunea dintre celule și biomaterial reprezintă un factor determinant pentru succesul aplicațiilor biomedicale. Dincolo de supraviețuire, răspunsul celular este influențat de proprietățile fizico-chimice ale materialului, cum ar fi topografia, rigiditatea sau compoziția chimică, care pot modula comportamentul celular la nivel molecular și structural. Astfel, analiza răspunsului celular devine un instrument esențial pentru înțelegerea modului în care aceste materiale pot fi utilizate în aplicații regenerative sau de substituție tisulară [1], [2].

Metodele actuale de evaluare celulară pun accent nu doar pe determinarea viabilității, ci și pe observarea directă a organizării celulare și a interacțiunilor celulă -biomaterial. Tehnicile bazate pe fluorescență permit vizualizarea în timp real a morfologiei celulare, oferind indicii despre integritatea membranei și despre distribuția acestora în cadrul structurii analizate. Aceste informații contribuie la caracterizarea performanței biomaterialelor într-un mod mai complex decât simpla cuantificare a celulelor vii [3], [4].

În acest studiu, au fost investigate scaffold-uri concepute pentru a oferi un mediu favorabil dezvoltării celulare, urmărindu-se influența compoziției asupra comportamentului celular. Analiza a fost realizată pe probe pe bază de gelatină metacrilată (GelMA), gumă gellan

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

metacrilată (GellanMA) și diferite concentrații de oxid de grafenă (GO), evaluate la 1 și 3 zile prin test Live/Dead.

III.1.2. Matertiale și metode

Activitatea 3. Validarea in vivo a eficienței dispozitivelor REOSTEOMi

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

III.1.2.1. Materiale

Cultura celulară MG-63 (CLS Cell Lines Service GmbH, Heidelberg, Germania) a fost utilizată pentru toate experimentele. Aceasta a fost cultivată în mediu Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SUA), cu 10% ser fetal bovin (FBS; Gibco™, Thermo Fisher Scientific) și 1% soluție de Penicilină-Streptomycină 100× (Gibco™, Thermo Fisher Scientific). Pentru evaluarea răspunsului celular s-a utilizat kitul comercial Live/Dead Viability/Cytotoxicity Kit, for mammalian cells achiziționat de la Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, SUA). Soluția de tampon fosfat salin (PBS) a fost furnizată de Sigma Aldrich Merck (Darmstadt, Germany), iar tripsina de Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, SUA)

III.1.2.1. Însămânțarea celulelor și pregătirea probelor

Pentru evaluarea interacțiunilor dintre celule și biomaterial, au fost selectate câte 4 probe pentru fiecare tip de structură, acestea fiind ulterior plasate în plăci Petri. În vederea asigurării unui mediu aseptice, probele au fost introduse într-o hotă cu flux laminar vertical și supuse unui proces de sterilizare cu radiații UV, timp de o oră pentru fiecare suprafață, cu scopul eliminării eventualelor contaminări microbiene. Pregătirea suspensiei celulare a implicat detașarea celulelor cu ajutorul tripsinei. Inițial, mediul de cultură din flask-uri a fost îndepărtat, iar suprafețele au fost spălate de două ori cu câte 5 ml de PBS. Ulterior, s-au adăugat 2 ml de soluție de tripsină, iar celulele au fost incubate timp de 3 minute pentru a facilita

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

desprinderea acestora de pe substrat. După detașare, celulele au fost resuspendate în 6 ml de mediu complet și omogenizate ușor, iar suspensia rezultată a fost transferată într-un tub de 50 ml. Aceasta a fost centrifugată la 1300 rpm timp de 3 minute, după care supernatantul a fost îndepărtat.

Celulele astfel detașate au fost resuspendate în 1 ml de mediu complet, iar densitatea celulară a fost determinată prin metoda colorării cu albastru tripan. Suspensia celulară a fost ulterior ajustată prin diluție până la atingerea concentrației dorite, iar pe fiecare probă au fost însămânțate 250 000 de celule. Plăcile au fost incubate în condiții standard, în prezența a 2 ml/placă de mediu complet, asigurându-se astfel un contact adecvat între celule și biomaterial. Viabilitatea celulară a fost evaluată după 1 și 3 zile de cultură.

III.1.2.2. Evaluarea viabilității celulare prin marcare Live/Dead la 1 și 3 zile

Activitatea 3. Validarea in vivo a eficienței dispozitivelor REOSTEOMi

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

Pentru determinarea viabilității celulare pe suprafețele biomaterialelor a fost realizat testul Live/Dead, o metodă bazată pe utilizarea unor coloranți fluorescenți care permit diferențierea celulelor viabile de cele neviabile. În etapa inițială, soluția de PBS a fost adusă la temperatura de 37°C, iar reactivii kit-ului, respectiv Calcein AM și Ethidium homodimer, au fost menținuți la temperatura camerei pentru a preveni apariția șocului termic. Întreaga procedură experimentală a fost realizată în întuneric, în scopul evitării degradării fotochimice a coloranților.

Soluția de lucru a fost preparată într-un tub de 15 ml prin combinarea a 10 ml PBS cu 5 μl de Calcein AM și 20 μl de Ethidium homodimer. Plăcile de cultură celulară au fost scoase din incubator, mediul de cultură a fost îndepărtat din godeuri, iar acestea au fost spălate de două ori cu câte 1 ml PBS pentru eliminarea reziduurilor de mediu. Ulterior, în fiecare godeu a fost adăugat 1 ml din soluția Live/Dead, după care plăcile au fost acoperite cu folie 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

aluminiu și incubate timp de 40 de minute în absența luminii, pentru a permite o colorare eficientă și uniformă a celulelor.

La finalul incubării, soluția de colorare a fost îndepărtată, iar godeurile au fost completate cu 1 ml PBS pentru etapa de vizualizare. Analiza a fost realizată cu ajutorul unui microscop de fluorescență (Dmi8 Leica, Germania), utilizând filtrele corespunzătoare lungimilor de undă specifice fiecărui colorant. Această abordare permite aprecierea directă a viabilității celulare și oferă informații relevante privind biocompatibilitatea materialelor investigate.

III.1.3. Rezultate și discuții

Activitatea 3. Validarea in vivo a eficienței dispozitivelor REOSTEOMi

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

Evaluarea viabilității celulelor MG-63 cultivate pe scaffold-urile 3D a evidențiat o capacitate favorabilă de adaptare și proliferare, susținând compatibilitatea biomaterialelor cu linia celulară utilizată. După 24 de ore de cultură (Figura 1), s-a constatat un nivel ridicat de viabilitate celulară, însă majoritatea celulelor se aflau încă într-o etapă incipientă de atașare la substrat. Din punct de vedere morfologic, acestea prezentau o formă ușor rotunjită, caracteristică fazei de acomodare și fixare pe suprafața materialului. Numărul redus de celule neviabile, evidențiate prin colorație roșie, indică faptul că etapele de manipulare și însămânțare nu au generat un stres semnificativ asupra culturilor celulare.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

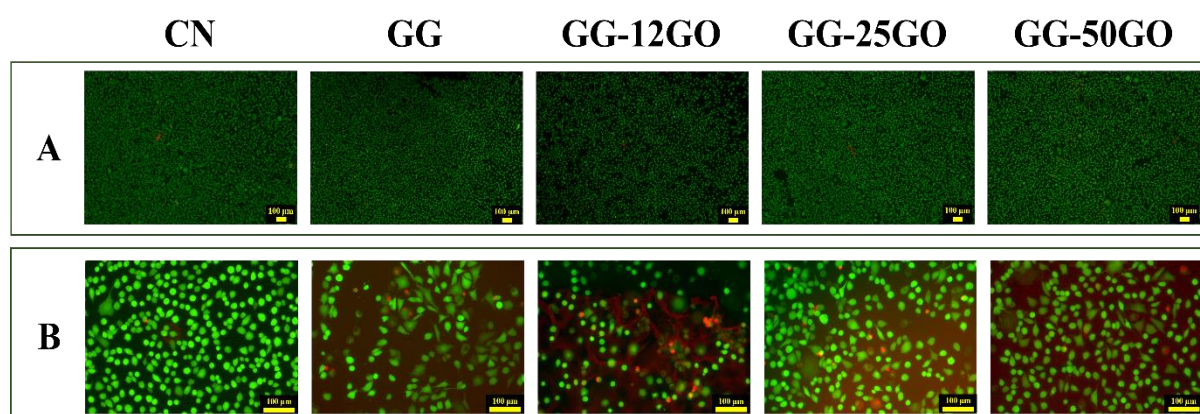


Figura 1. Imagini de microscopie de fluorescență a celulelor MG-63 după 24 de ore de contact cu scaffold-urile cu diferite concentrații de GO. (A) Magnificație $5\times$ și scală de 100 μm . (B) Celulele de pe suprafața scaffold-urilor la magnificație $20\times$ și scală de 100 μm .

La 3 zile de incubare (Figura 2) s-a observat o creștere evidentă a populației de celule viabile, marcate în verde, acestea prezentând o morfologie tipică, alungită, asociată cu o adeziune eficientă la suprafața scaffold-urilor cu un conținut de GO mai mic de 0.25%. La ambele intervale de timp studiate, se observă o relație între viabilitatea celulară și concentrație de GO, însă după 3 zile această relație devine mult mai evidentă. Astfel, celulele aflate în contact cu probele conținând 0.50% GO, au indicat o viabilitate mai scăzută după 3 zile. În contrast, scaffold-urile cu 0.125% GO au indicat o viabilitate celulară ridicată, cu o morfologie specifică celulelor osteoblaste aderate. În ansamblu, rezultatele obținute indică faptul că biomaterialele analizate susțin în mod diferențiat comportamentul celular, în funcție de concentrația de GO, evidențiind existența unui prag optim care favorizează atât viabilitatea, cât și adeziunea și organizarea morfologică a celulelor MG-63.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

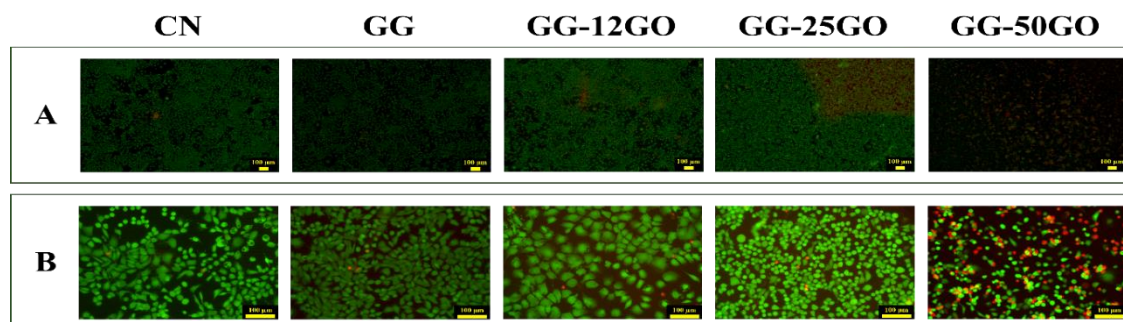


Figura 2. Imagini de microscopie de fluorescență a celulelor MG-63 după 3 zile de contact cu scaffold-urile cu diferite concentrații de GO. (A) Magnificație $5\times$ și scală de 100 μm . (B) Celulele de pe suprafața scaffold-urilor la magnificație $20\times$ și scală de 100 μm .

III.1.4. Concluzii

Rezultatele obținute în cadrul acestui studiu evidențiază faptul că scaffold-urile 3D investigate prezintă un potențial semnificativ pentru aplicații în ingineria tisulară, demonstrând o bună biocompatibilitate în raport cu linia celulară osteoblastică MG-63. Protocolul experimental adoptat, care a inclus etape riguroase de sterilizare, manipulare și însămânțare celulară, a permis obținerea unor condiții optime pentru evaluarea interacțiunii dintre celule și biomaterial. În urma testelor de viabilitate celulară de tip Live/Dead, s-a observat că, după 24 de ore de cultură, majoritatea celulelor au rămas viabile, însă se aflau într-un stadiu incipient de adeziune, caracterizat printr-o morfologie rotunjită. Acest aspect este în concordanță cu etapele inițiale ale procesului de atașare celulară, în care celulele își adaptează structura la suprafața substratului. Procentul redus de celule neviabile indică faptul că biomaterialele nu au indus efecte citotoxice imediate, iar procesul de manipulare nu a afectat semnificativ integritatea celulară. După 3 zile de cultură, s-a evidențiat o evoluție clară a comportamentului celular, manifestată prin creșterea numărului de celule viabile și prin modificări morfologice sugestive pentru o adeziune stabilă și inițierea proliferării. Celulele au prezentat o formă

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

alungită, specifică osteoblastelor bine fixate pe substrat, iar distribuția lor uniformă pe suprafața scaffold-urilor indică o interacțiune favorabilă între celule și arhitectura materialului.

Un aspect esențial evidențiat de acest studiu îl reprezintă influența concentrației de GO asupra viabilității celulare. Rezultatele indică existența unei corelații directe între concentrația de GO și răspunsul celular, această relație devenind mai pronunțată în timp. Scaffold-urile cu un conținut redus de GO (0,125%) au demonstrat cea mai bună performanță biologică, susținând o viabilitate celulară ridicată și o morfologie caracteristică celulelor osteoblaste aderente. În schimb, creșterea concentrației de GO la 0,50% a condus la o diminuare a viabilității după 3 zile, sugerând un posibil efect inhibitor sau citotoxic la concentrații mai mari. În concluzie, studiul demonstrează că biomaterialele pe bază de GelMA, GellanMA și funcționalizate cu concentrații optime de GO, pot susține eficient viabilitatea și dezvoltarea celulelor osteoblaste, deschizând perspective favorabile pentru utilizarea acestora în domeniul biomedical.

Bibliografie

- [1] C. Hu *et al.*, “Live-dead assay on unlabeled cells using phase imaging with computational specificity,” *Nature Communications* 2022 13:1, vol. 13, no. 1, pp. 1–8, Feb. 2022, doi: 10.1038/s41467-022-28214-x.
- [2] M. V. Nasonova, T. V. Glushkova, V. V. Borisov, E. A. Velikanova, A. Y. Burago, and Y. A. Kudryavtseva, “Biocompatibility and Structural Features of Biodegradable Polymer Scaffolds,” *Bull. Exp. Biol. Med.*, vol. 160, no. 1, pp. 134–140, Nov. 2015, doi: 10.1007/S10517-015-3114-3/METRICS.
- [3] P. S. Timiri. Shanmugam, Thamizharasan. Sampath, and Indumathy. Jagadeeswaran, “Biocompatibility protocols for medical devices and materials,” p. 240, 2023, Accessed: Nov. 24, 2025. [Online]. Available: https://books.google.com/books/about/Biocompatibility_Protocols_for_Medical_D.html?hl=ro&id=jn-HEAAAQBAJ

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

- [4] T. Riss, A. Niles, R. Moravec, N. Karassina, and J. Vidugiriene, “Cytotoxicity Assays: In Vitro Methods to Measure Dead Cells,” *Assay Guidance Manual*, May 2019, Accessed: Nov. 24, 2025. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/books/NBK540958/>

III.2. Capioul 2

III.2. Obținerea de substituenți osoși pentru validare *in vitro* și *in vivo*

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

Subactivitatea 3.1. Validarea substituenților osoși în modele de șoarece.

III.2.1. Introducere

Obținerea de substituenți osoși cu rezistență mecanică adecvată și proprietăți funcționale capabile să susțină regenerarea tisulară, în special în patologii complexe precum mielomul multiplu, a necesitat dezvoltarea unor sisteme biomateriale avansate care să asigure atât stabilitate structurală, cât și un răspuns biologic favorabil în mediul fiziologic. În acest sens, selecția materialelor reprezintă un pas critic, deoarece acestea trebuie să fie biocompatibile, să permită interacțiuni eficiente cu celulele și să prezinte proprietăți mecanice apropiate de cele ale țesutului osos, fără a induce răspunsuri adverse. De asemenea, este necesară proiectarea unor structuri poroase și interconectate, care să faciliteze migrarea celulară, vascularizarea și schimbul de nutrienți, aspecte esențiale pentru formarea de țesut nou. În cazul sistemelor hidrogelice, proprietățile inițiale ale materialelor sunt adesea insuficiente pentru a asigura stabilitatea în mediul biologic, ceea ce impune utilizarea unor strategii de reticulare. Reticularea permite formarea unei rețele tridimensionale stabile, creșterea rezistenței mecanice și controlul degradării în timp, contribuind la menținerea integrității structurale a scaffoldului pe durata procesului de regenerare. În plus, ajustarea compoziției și a gradului de reticulare oferă posibilitatea de a regla fin proprietățile fizico-chimice și biologice ale materialului, astfel încât acesta să răspundă cerințelor specifice ale aplicației. Prin urmare, combinarea selecției adecvate a materialelor cu strategii eficiente de stabilizare structurală reprezintă o etapă esențială în dezvoltarea unor substituenți osoși performanți.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

În acest context, în această etapă au fost concepute formulări compozite bazate pe gelatina metacrilată (GelMA) și gellan metacrilat (GGMA), materiale cunoscute pentru biocompatibilitate, capacitate de reticulare și versatilitate în procesare. Integrarea oxidului de grafenă (GO, 0,125% din masa polimerului) a urmărit îmbunătățirea proprietăților mecanice, creșterea rigidității rețelei și modularea interacțiunilor cu biomoleculele, inclusiv prin efecte asupra adeziunii și diferențierii celulare. Stabilizarea inițială a structurilor s-a realizat prin fotoreticulare UV (405 nm) în prezența unui fotoinițiator (LAP, 0,15% raportat la masa polimerului), conducând la formarea rapidă a unei rețele polimerice stabile, compatibilă cu menținerea formei după procesul de printare.

Pentru a extinde controlul asupra proprietăților finale ale substituenților osoși, aceste sisteme au fost proiectate pentru etape suplimentare de reticulare și modificare structurală prin iradiere fiind transferate către partenerii din China de la Peking University. Acolo probele obținute vor fi supuse tratamentelor cu fascicul de electroni (electron beam) la energii diferite (de exemplu, 2 MeV și 10 MeV), cu dimensiuni ale probelor ajustate în funcție de adâncimea de penetrare, precum și iradierii cu fascicul ionic pentru modificări la nivel de suprafață. Aceste tratamente permit inducerea de reticulări suplimentare, reorganizarea rețelei polimerice și ajustarea proprietăților mecanice și de suprafață, fără introducerea unor agenți chimici suplimentari. Ulterior iradierii, substituenții osoși vor fi evaluați printr-un set extins de caracterizări structurale și funcționale, incluzând tehnici precum SEM, FTIR, XPS, Raman sau XRD pentru analiza compoziției și morfologiei, precum și teste mecanice de tip nanoindentare pentru determinarea rigidității. În paralel, sunt prevăzute studii de degradare, umflare și evaluări biologice *in vitro* (viabilitate și diferențiere celulară), care vor permite corelarea modificărilor induse de iradiere cu răspunsul biologic.

III.2.2. Materiale și tipuri de probe ce au fost preparate

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

Subactivitatea 3.1. Validarea substituenților osoși în modele de șoarece.

III.2.2.1. Materiale

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

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

Subactivitatea 3.1. Validarea substituenților osoși în modele de șoarece.

Gelatina din piele de pește de apă rece (teleostean, BioReagent, solidă, lot SLCC7087, G7041-500), guma gellan (Gelzan™ CM, G1919-250G, $M = 1.000 \text{ kg mol}^{-1}$), pulberea de GO ($\text{C}_x\text{O}_y\text{H}_z$, 796034, 15–20 straturi, 4–10% oxidare la margini), litiu fenil-2,4,6-trimetilbenzoilfosfinat (LAP, $\geq 95,0\%$, 900889-1G, pulbere cristalină) și anhidrida metacrilică ($[\text{H}_2\text{C}=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CO}]_2\text{O}$, $\geq 94\%$, CAS 760-93-0, $154,16 \text{ g mol}^{-1}$) au fost achiziționate de la Sigma-Aldrich (Darmstadt, Germania). Toți reactivii sunt de puritate analitică și au fost utilizați ca atare. Pentru toate etapele apoase se utilizează apă ultrapură.

III.2.2.2. Prepararea formulărilor pe bază de GelMA -GGMA / GO

Substituirea grupărilor amino ale gelatinei cu grupări metacrilice se va realiza prin dizolvarea a 20 g de gelatină în 400 mL PBS (pH = 7,4), la 50°C , sub agitare continuă într-o baie de apă timp de 2 ore. Ulterior, se vor adăuga picătură cu picătură 0,745 mL de anhidridă metacrilică, menținând pH-ul în intervalul 7,4–7,7 prin adăugare de NaOH 5M. După 4 ore de reacție sub agitare, aceasta va fi oprită prin adăugarea a 100 mL PBS, iar soluția va fi transferată în membrane de dializă (MWCO = 14000 Da) și dializată împotriva apei deionizate timp de 3 zile. Ulterior, soluția va fi colectată și liofilizată pentru utilizare ulterioară.

În mod similar, GellanMA va fi obținut prin substituirea grupărilor hidroxil din unitățile repetitive ale gumei gellan cu grupări metacrilice. Mai întâi, 5 g de gumă gellan vor fi dizolvate în 500 mL PBS la 90°C timp de 2 ore. pH-ul soluției va fi menținut în intervalul 8,0–8,5 înainte și după adăugarea treptată a 20 mL de anhidridă metacrilică. Reacția va fi menținută timp de 4 ore și oprită prin adăugarea a 100 mL PBS. Soluția va fi apoi dializată împotriva apei deionizate, utilizând membrane cu prag de tăiere de 14000 Da, timp de 3 zile, înainte de liofilizare. În ambele procese, apa deionizată utilizată pentru dializă va fi înlocuită zilnic.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

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 va începe prin dispersarea GO în apă ultrapură. Mai întâi, dispersia de GO, la concentrația indicată în Tabelul 1, va fi supusă ultrasonării (ultrasonicator VCX 750, Sonics & Materials, Inc., Newton, CT, SUA) timp de 2 ore, la o amplitudine de 25%, cu un regim de impuls/pauză de 15 s/5 s, într-o baie de gheață. Ulterior, se va adăuga GellanMA în concentrație de 6% (m/v) în dispersie, sub agitare magnetică, la 90°C, într-o baie de apă, și se va lăsa la dizolvat timp de 1 oră. În continuare, temperatura băii va fi redusă la 40°C, iar GelMA, în concentrație de 24% (m/v), va fi adăugat lent și omogenizat timp de 1 oră sub agitare continuă. LAP va fi utilizat drept fotoinițiator, la o concentrație de 0,15% (m/m) raportată la concentrația totală de polimer.

Pentru fiecare formulare vor fi turnate atât structuri 3D, cât și filme obținute prin dropcasting, utilizând metodele prezentate mai jos. Pentru realizarea structurilor 3D turnate în petriuri de plastic. Procesul de reticulare va fi realizat cu ajutorul unei bioprintere 3D BIO X6 (Cellink, Gothenburg, Suedia), echipată cu un sistem de control al temperaturii. După turnare, scaffoldurile vor fi reticulate cu lumină ultravioletă (UV) la 405 nm, timp de 6 minute pentru probele turnate și 60 secunde pentru probele care sunt film. În ceea ce privește filmele obținute prin turnare, amestecurile vor fi turnate cu grijă pe matrițe plane din material plastic inert, într-un volum de 0,2-0,5 mL, ajustat astfel încât să se obțină o grosime finală țintă de aproximativ 10-50 μm. Evaporarea solventului va fi realizată în condiții ambientale controlate, timp de 48-72 ore, pentru a permite formarea unor filme subțiri uniforme. Filmele rezultate vor fi desprinse ușor de pe substrat, iar grosimea finală va fi măsurată cu ajutorul unui dispozitiv de măsurare a grosimii, confirmând o valoare medie de aproximativ 10-50 μm. Filmele obținute vor fi ulterior fotoreticulate utilizând un fascicul UV cu lungimea de undă de 405 nm.

În concluzie, vor fi obținute două tipuri de probe: structuri 3D printate și filme obținute prin turnare. Ambele tipuri de probe vor fi preparate utilizând patru formulări hidrogelice (Tabelul 1), compuse din GelMA și GellanMA, în prezența sau absența GO.

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

Tabel 1. Concentrațiile componentelor utilizate în formulările de bioink multicomponent

	Hydrogel Composition	GelMA (w/v %)	GGMA (w/v%)	GO (w/w %din masa de polimer)	Reticulare (UV 405 nm)	LAP (w/w % din masa de polimer)
1.	GelMA + GGMA	24%	6%	-	Yes	0.15%
2.	GelMA + GGMA	24%	6%	-	No	0
3.	GelMA + GGMA+ GO	24%	6%	0,125%	Yes	0.15%
4.	GelMA + GGMA+ GO	24%	6%	0,125%	No	0
5.	GelMA (control 1)	24%	0%	-	Yes	0.15%
6.	GelMA (control 2)	24%	0%	-	No	0

2.4. Formatele probelor

Pentru fiecare formulare vor fi preparate următoarele tipuri de probe:

- structuri printabile de formă pătrată, cu dimensiunile $10 \times 10 \times 3$ mm (L \times l \times h)
- filme subțiri, cu grosimi cuprinse între 10-50 μ m și/sau 100-500 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

III.2.3. Rezultate și discuții

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

Subactivitatea 3.1. Validarea substituenților osoși în modele de șoarece.

Scopul acestei activități a fost prepararea și furnizarea unui set de substituenți osoși/structuri biofuncționale pe bază de GelMA și GGMA, obținute atât sub formă de structuri tridimensionale, cât și de filme realizate prin turnare, în variante reticulate și nereticulate, cu grosimi controlate. Aceste tipuri de probe au fost concepute astfel încât să permită modificarea lor ulterioară prin fascicul de electroni, în cazul structurilor 3D mai groase (10 MeV), și prin fascicul ionic, în cazul filmelor subțiri (2 MeV), în cadrul experimentelor planificate în laboratorul dumneavoastră. S-a realizat de asemenea sinteza unor formulări GelMA-GGMA, cu și fără GO, utilizând metoda turnări pentru structuri și metoda de drop-casting pentru filme. Ulterior, aceste formulări vor fi supuse iradierii cu scopul de a induce legături covalente între lanțurile polimerice și de a evalua modul în care tipul de iradiere, doza aplicată și condițiile experimentale influențează gradul de reticulare la scară moleculară.

Rezultatele inițiale obținute în urma iradierii, inclusiv prin utilizarea ionilor de carbon și oxigen, vor contribui la investigarea formării de legături între două, trei sau mai multe lanțuri peptidice de gelatină, oferind astfel informații importante privind mecanismele de conectare intermoleculară induse prin radiație. Aceste date vor permite identificarea celor mai promițătoare formulări și vor constitui baza pentru conturarea unei posibile aplicații comune de proiect. În acest context, cercetarea va furniza, în primul rând, protocoale de procesare pentru fabricarea unor structuri 3D și a unor filme subțiri pe bază de hidrogeluri GelMA-GGMA/GO. În al doilea rând, va genera date privind răspunsul la doză pentru tratamentele cu fascicul de electroni și fascicul ionic aplicate materialelor obținute. În final, va permite selectarea formulărilor cu cel mai mare potențial pentru dezvoltarea ulterioară a unor direcții

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

comune de cercetare. Mai specific, activitatea experimentală a condus la obținerea hidrogelurilor GelMA-GGMA și GelMA-GGMA cu 0,125% GO (m/m), atât reticulate și nereticulate, precum și fabricarea acestora sub formă de structuri 3D și filme subțiri (tabel 2). După sinteza probelor acestea au fost congelate și apoi liofilizate pentru o manipulare adecvată pentru depozitare și transportare mai ușoară.

Astfel, în Figura 1 sunt prezentate probele obținute în urma sintezei, fiind evidențiate aspectul microscopic, forma finală, în funcție de compoziția formulării și metoda de obținere. Aceste probe vor fi ulterior trimise către Universitatea Peking din China, unde vor fi supuse unor teste suplimentare, în vederea evaluării comportamentului lor în condiții experimentale specifice și a validării performanței acestora.

Într-o etapă viitoare, aceste probe vor putea fi utilizate pentru investigații mai avansate, menite să evidențieze impactul modificărilor induse prin iradiere asupra proprietăților structurale și funcționale ale materialelor. În acest context, caracterizarea fizico-chimică inițială va putea fi realizată în laboratorul dumneavoastră, pentru a permite compararea directă cu rezultatele obținute după modificarea prin fascicul de electroni și fascicul ionic. În paralel, vor fi investigate efectele moleculare ale iradierii prin utilizarea unor tehnici de caracterizare precum fracția gel, gradul de umflare, FT-IR și spectrometria de masă (peptide mapping), cu scopul de a identifica intervalele de doză care favorizează formarea de legături între două, trei sau mai multe lanțuri peptidice. Aceste analize vor permite, totodată, diferențierea între grefarea pe un singur lanț și reticularea între mai multe lanțuri, iar semnăturile moleculare astfel obținute vor fi corelate ulterior cu proprietățile mecanice macroscopice ale materialelor. În perspectivă, aceste rezultate vor sta la baza extinderii studiului către evaluări biologice și funcționale mai avansate, precum și către optimizarea formulărilor pentru aplicații specifice.

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

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

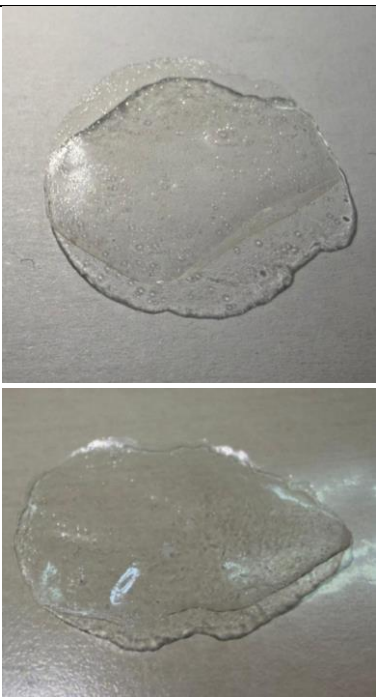
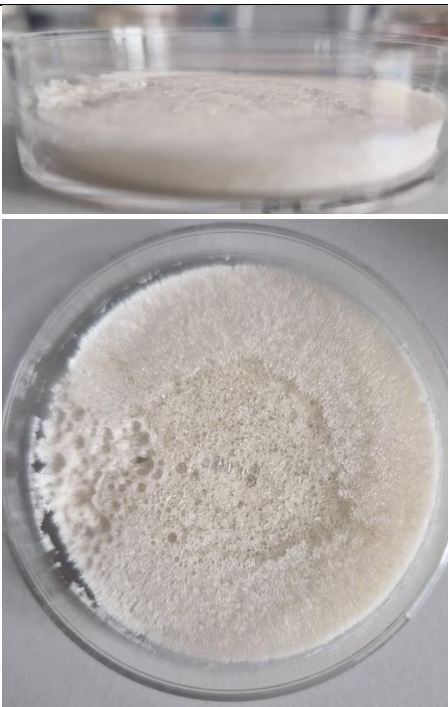
Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

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. Tipurile de probe obținute și caracteristicile lor dimensionale

Proba	Tip probă	
	Film	Structură
GelMA + GGMA+LA P		

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

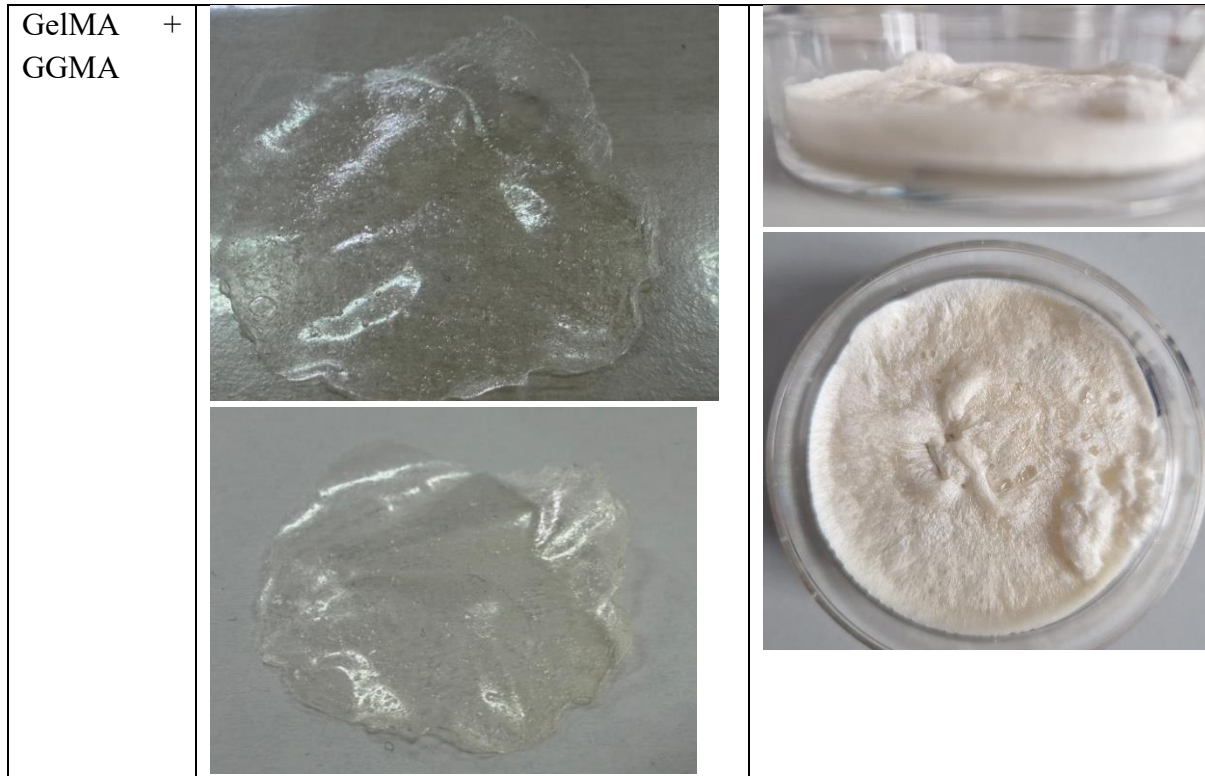
Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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



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

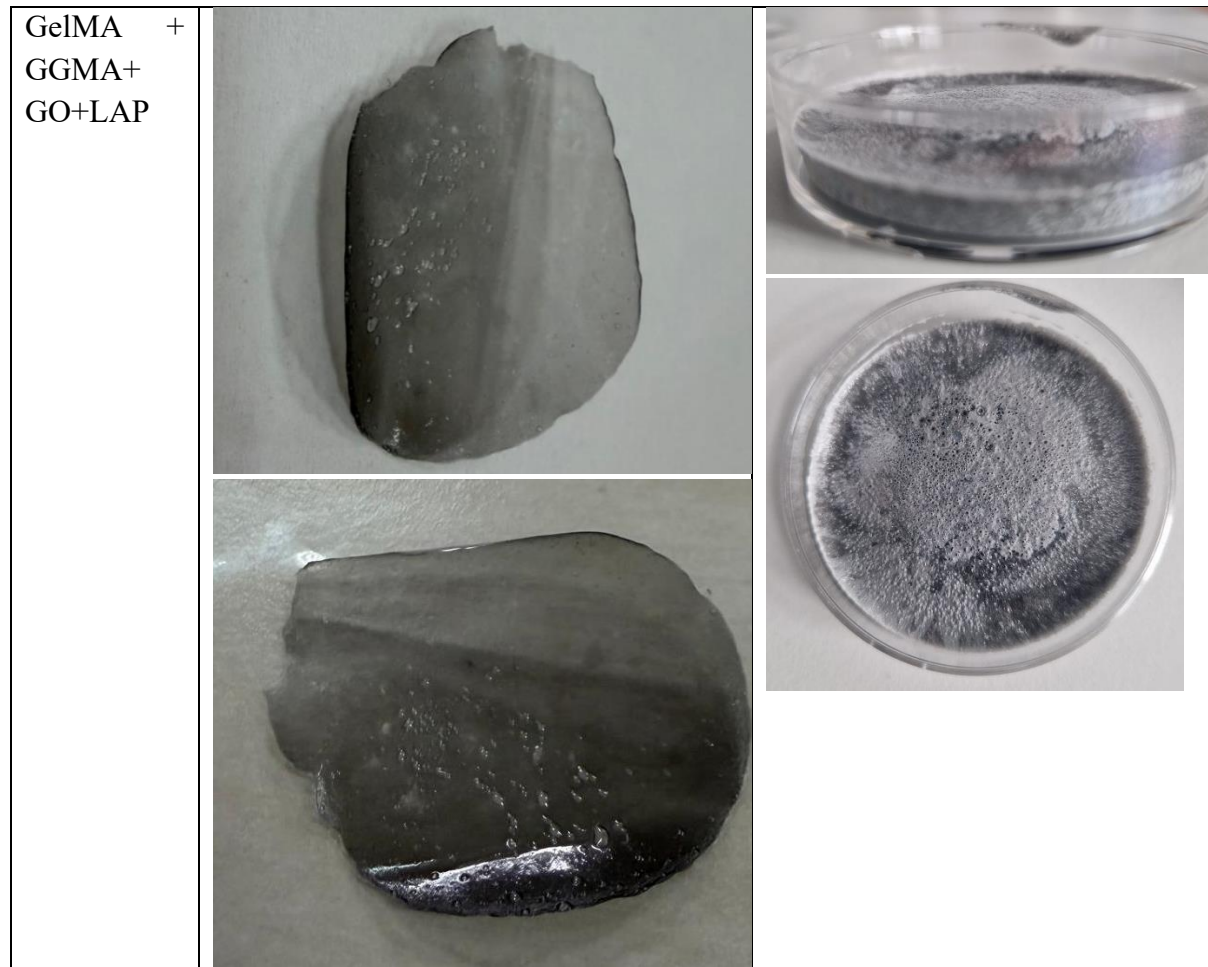
Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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



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

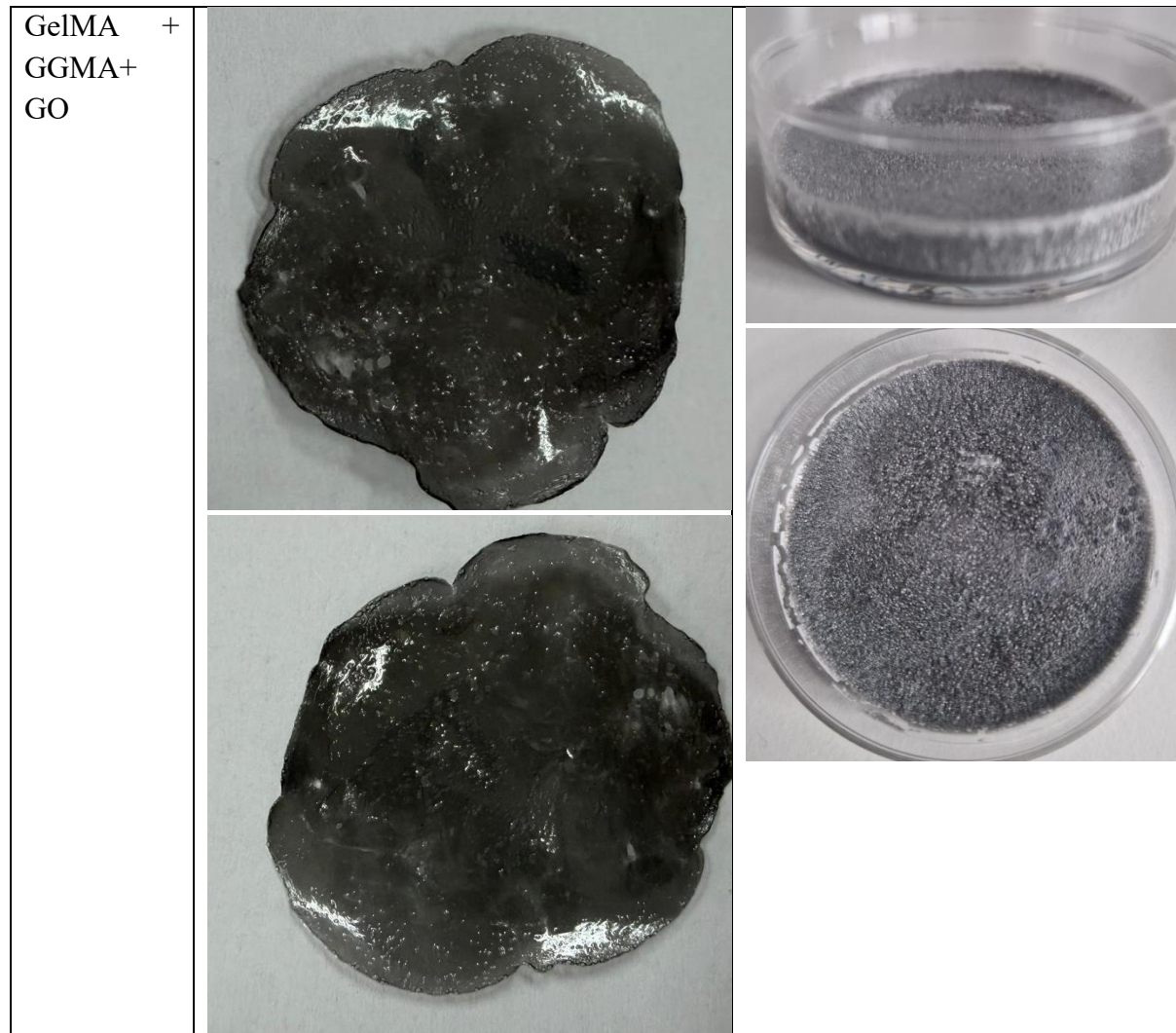
Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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



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

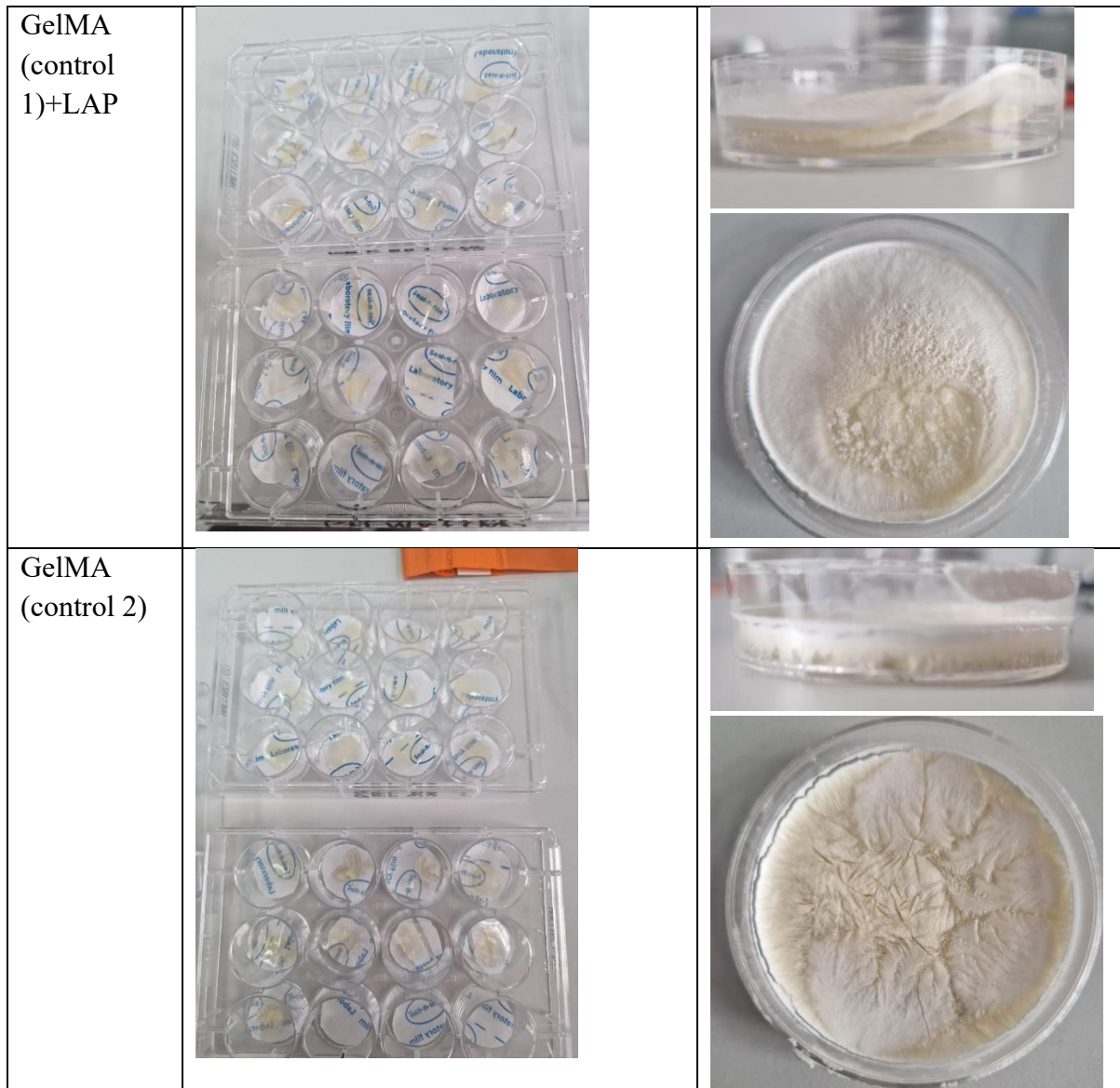
Investiția 8: „Dezvoltarea unui program pentru atragerea resurselor umane înalt specializate din străinătate în activități de cercetare, dezvoltare și inovare” PNRR-III-C9-2022 – I8

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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



III.2.4. Concluzii

În cadrul acestei etape, s-au obținut cu succes hidrogeluri pe bază de GelMA și GellanMA, atât în absența, cât și în prezența oxidului de grafenă (GO), în variante reticulate și nereticulate, demonstrând posibilitatea ajustării compoziției și a stării de reticulare în funcție

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

de aplicația vizată. De asemenea, s-au realizat două tipuri distincte de probe, respectiv structuri tridimensionale și filme subțiri, utilizând metode complementare de procesare, ceea ce a permis obținerea unor materiale cu geometrii și grosimi controlate. Procesele de sinteză, turnare și fotoreticulare au condus la formarea unor structuri stabile, cu integritate macroscopică bună și manipulabilitate adecvată. Integrarea oxidului de grafenă în matricea polimerică a demonstrat fezabilitatea obținerii unor formulări compozite, cu potențial de îmbunătățire a proprietăților mecanice și de interacțiune cu biomoleculele. Totodată, utilizarea fotoreticulării UV a permis stabilizarea rapidă a rețelei polimerice, menținând forma structurilor obținute. Probele preparate au fost pregătite corespunzător pentru etapele ulterioare de modificare prin iradiere, fiind supuse proceselor de congelare și liofilizare pentru a facilita depozitarea și transportul. Acestea vor fi transmise către partenerii de la Universitatea Peking, unde vor fi supuse tratamentelor cu fascicul de electroni și fascicul ionic, în vederea investigării modificărilor structurale induse. În ansamblu, rezultatele obținute au demonstrat reproductibilitatea procesului de preparare și versatilitatea sistemelor hidrogelice dezvoltate, constituind o bază solidă pentru studiile ulterioare privind reticularea indusă prin iradiere, caracterizarea moleculară și corelarea cu proprietățile mecanice și biologice ale materialelor.

CONCLUZII GENERALE

Activitățile desfășurate în perioada ianuarie-martie 2026 au contribuit semnificativ la avansarea obiectivelor propuse în cadrul proiectului REOSTEOMi, prin dezvoltarea și optimizarea unor sisteme biomateriale destinate regenerării osoase, precum și prin consolidarea etapelor experimentale necesare validării lor biologice ulterioare. Rezultatele obținute în această etapă arată că cercetarea a urmărit atât partea de formulare și procesare a materialelor, cât și componenta biologică necesară pentru utilizarea lor în aplicații relevante din domeniul medicinei regenerative.

Un rezultat important al acestei etape a fost obținerea și evaluarea unor formulări printabile pe bază de alginat și κ -caragenan, destinate atât printării 3D, cât și bioprintării 3D 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

osteoblaste MC3T3-E1. Studiile efectuate au arătat că performanța acestor sisteme depinde în mod direct de compoziția formulării, de condițiile de pregelifiere și de parametrii de printare utilizați. Modificarea concentrației polimerilor, a raportului dintre aceștia și a condițiilor de gelificare a influențat clar comportamentul materialului în timpul extrudării, fidelitatea formei obținute și stabilitatea suporturilor după printare. Aceste rezultate au evidențiat faptul că obținerea unei bio-formulări eficiente necesită un echilibru atent între vâscozitate, stabilitate și compatibilitate biologică.

Dintre formulările analizate, anumite compoziții au prezentat un comportament superior din punct de vedere al printabilității, permițând obținerea unor structuri mai uniforme, mai stabile și cu o fidelitate geometrică mai bună. În același timp, rezultatele au arătat că procesul de gelificare ionică are un rol esențial în stabilizarea suporturilor printate, iar alegerea condițiilor eficiente, este foarte importantă mai ales atunci când materialul este destinat utilizării în prezența celulelor. În acest sens, optimizarea condițiilor de reticulare a permis obținerea unor structuri suficient de stabile pentru testele ulterioare, fără a introduce un stres suplimentar inutil asupra sistemului biologic.

Un alt aspect relevant urmărit în această etapă a fost evaluarea stabilității structurilor printate în medii diferite. Rezultatele au arătat că hidrogelurile dezvoltate prezintă sensibilitate la mediile care conțin ioni monovalenți, ceea ce poate conduce la pierderea rapidă a integrității structurale. Totuși, prin ajustarea compoziției mediului de incubare, în special prin suplimentarea cu ioni de calciu, a fost posibilă îmbunătățirea semnificativă a stabilității probelor. Acest lucru este important deoarece arată că performanța acestor sisteme nu depinde doar de compoziția biomaterialului, ci și de mediul în care acesta este utilizat și evaluat.

Rezultatele obținute în cadrul bioprintării au arătat, de asemenea, că temperatura de procesare influențează în mod direct comportamentul formulărilor și calitatea structurilor obținute. S-a observat că lucrul la temperaturi mai scăzute a favorizat menținerea formei după extrudare și a îmbunătățit fidelitatea geometrică a structurilor, datorită creșterii stabilității

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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

materialului imediat după depunere. În același timp, aceste observații au subliniat importanța controlului atent al parametrilor de lucru, deoarece chiar și mici variații experimentale pot influența atât calitatea suportului obținut, cât și răspunsul biologic al celulelor incluse în sistem.

Din punct de vedere biologic, rezultatele au arătat că formulările dezvoltate pot susține viabilitatea celulară pe termen scurt, ceea ce confirmă compatibilitatea lor de bază cu modelul celular osteoblastic utilizat. Testele de viabilitate au indicat prezența unui număr important de celule vii în primele zile după bioprintare, sugerând că materialele și condițiile de procesare alese sunt potrivite pentru menținerea inițială a celulelor în interiorul matricei. Scăderea progresivă a viabilității observată la intervale mai mari de incubare sugerează însă că sistemul necesită optimizări suplimentare, în special în ceea ce privește difuzia nutrienților, schimbul de oxigen, rigiditatea matricei și interacțiunea celule material. Aceste observații sunt importante deoarece arată clar direcțiile în care formulările trebuie îmbunătățite pentru a susține funcționalitatea biologică pe termen mai lung.

În paralel cu aceste studii, o contribuție importantă a acestei etape a fost și dezvoltarea unor formulări noi, îmbunătățite prin integrarea unor componente bioactive, precum spirulina. Rezultatele preliminare au sugerat că introducerea acestei componente poate influența favorabil atât comportamentul materialului în timpul printării, cât și răspunsul biologic al celulelor. Formulările care au inclus astfel de componente au arătat un potențial crescut pentru obținerea unor structuri mai bine adaptate cerințelor din ingineria tisulară osoasă. Acest aspect este relevant deoarece indică faptul că dezvoltarea substituenților osoși nu trebuie să urmărească doar obținerea unei structuri stabile, ci și crearea unui microambient mai favorabil pentru celule și pentru procesele de regenerare.

Un alt rezultat important al perioadei raportate a fost consolidarea bazei biologice necesare continuării experimentelor. Inițierea, extinderea și menținerea culturilor celulare pentru liniile MC3T3-E1, hMSC-BM și RPMI 8226 au fost realizate cu succes, ceea ce a permis pregătirea modelelor celulare relevante pentru etapele următoare ale proiectului.



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

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

Codul proiectului: 213

Contract de finanțare nr. 760093/23.05.2023

Beneficiar: UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

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

Această etapă a avut o importanță practică majoră, deoarece asigurarea unor culturi celulare stabile, viabile și reproductibile este esențială pentru desfășurarea corectă a tuturor experimentelor ulterioare. În același timp, acest progres experimental contribuie direct la crearea cadrului necesar pentru investigarea interacțiunii dintre biomaterialele dezvoltate și sistemele biologice relevante pentru regenerarea osoasă și pentru complicațiile asociate mielomului multiplu.

În ansamblu, rezultatele obținute în această etapă arată că activitatea de cercetare s-a desfășurat într-o manieră integrată și bine direcționată, generând date experimentale valoroase pentru continuarea proiectului. Au fost făcuți pași importanți atât în optimizarea formulărilor biomateriale, cât și în pregătirea și validarea condițiilor experimentale necesare pentru testarea lor biologică. Toate aceste rezultate susțin potențialul sistemelor dezvoltate pentru aplicații viitoare în regenerarea osoasă și oferă o bază solidă pentru etapele următoare de validare funcțională, evaluare in vivo și rafinare a substituenților osoși dezvoltați în cadrul proiectului.

Întocmit de membrii echipei de implementare,

Ing. Dobrișan Mihaela-Raluca

Dr. Ghiță Alina-Ioana

Drd. Ing. Toader Georgian Alin

Dr. Ing. Ghighină Elena (Cojocar)

Ing. Zsunkuly Andrea-Carolina

Avizat de responsabilul de proiect,

Prof. Dr. Ing. Mariana IONIȚĂ

Data: 31.03.2026

Data: 31.03.2026