

Raport Științific Etapa I / 2022

Kit pentru regenerare osoasă personalizată; o strategie pentru viitor

Acronim REOSTEOKIT

PN-III-P4-PCE-2021-0244

PCE 103/2022

Obiectivul general al proiectului REOSTEOKIT este de a îmbunătăți statusul de sănătate al societății, prin introducerea unor abordări unice pentru medicina regenerativă osoasă, care nu numai îmbunătățește terapiile substitutive celulare existente pentru afecțiunile grave precum fracturi osoase întârziate și neunionale, dar asigură tranziția holistică de la medicina regenerativă convențională către medicina integrativă personalizată. Obiectivul REOSTEOKIT este să ofere un kit de reconstrucție osoasă, care îmbine terapia eficientă din punct de vedere al costurilor și cu eficiența mult îmbunătățită față de soluțiile convenționale de tratament utilizate pentru restaurarea defectelor osoase și un dispozitiv fiabil de monitorizare în timp real a potențialului osteogenic a celulelor stem mezenchimale umane: o măsură cantitativă a formării de os. Îndeplinirea cu succes a principalelor obiective tehnice va genera publicații în jurnale de top, prezentări la evenimente internaționale care vizează diseminarea, informarea și susținabilitate prin Proprietatea Intelectuală generată și creșterea vizibilității internaționale a cercetării științifice românești.

În prima etapă a proiectului am avut în vedere Dezvoltarea formulărilor printabile de bază (inkuri / cerneluri); inkuri conductoare pe baza de grafen și inkuri pentru substituent osos (Activitatea 1 și am efectuat experimente aferente subactivităților A1.1-A1.6. În cele ce urmează prezentăm o parte dintre rezultatele științifice aferente etapei.

În vederea identificării componentelor cheie și avansarea unei serii de inkuri / cerneluri de bază urmata de sinteza de inkuri / cerneluri nanocompozite prin amestecarea cu oxid de grafen (GO) exfoliat corespunzător, testării din punct de vedere reologic a inkurilor / cernelurilor și modularea vâscozității, urmată de testarea preliminară pentru printare 3D (depunere prin injecție) dar și realizarea unor teste fizico-chimice, morfo-structurale inițiale am efectuat o serie de experimente iar rezultatele cele mai promitatoare sunt raportate mai jos.

I. Sinteza si caracterizarea de formulari printabile pe baza de gelatina metacrilata (GelMA), gellan metacrilat(GGMA) si formulari printabile nanocompozite pe baza de gelatina metacrilata (GelMA), gellan metacrilat(GGMA) si oxid de grafena (GO)

Sinteza GGMA. Sinteza de gellan funcționalizat cu grupari metacrilat (GGMA) a fost realizata prin reacția gelanului cu anhidridă metacrilică conform protocolului descris in (1). Gradul de substitutie a fost determinat 8% prin spectrometrie ^1H -RMN, folosind ecuația 1, unde semnalul caracteristic gruparii metil de pe unitatea structurală, ramnoză a fost utilizată ca referință (1,45 ppm).

$$DS = \frac{\frac{I_{DB}}{\eta_{H_{DB}}} / \frac{I_{CH_3rham}}{\eta_{H_{CH_3rham}}}}{\eta_{OH_{monomer}}}$$

Eq 1: , unde I_{DB} reprezinta integrarea semnalului pentru dublă legătură(c), I_{CH_3rham} este integrarea peakului de referință (a), $\eta_{H_{DB}}$ și $\eta_{H_{CH_3rham}}$ sunt numărul de protoni din legătura dublă și respectiv, din grupa metil de pe ramnoza, și $\eta_{OH_{monomer}}$ este numărul de grupe hidroxil reactive din Gelan.

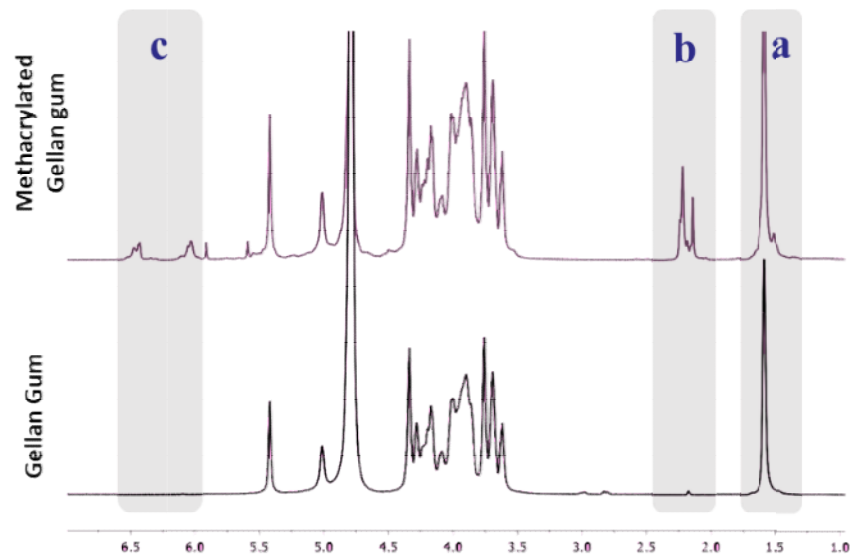


Fig. 1. Spectrele ^1H -RMN pentru gelan si gelan metacrilat.

Obținerea de formulari printabile si influenta GO. Pentru a studia influenta continutului de GO au fost preparate formulari printabile de diferite concentratii. Dispersii de GO s-au obtinut prin procesul de exfoliere la o concentratii de 0.6%, 1.2 si respectiv 2.4 wt/vol ce fost redispersată în suspensie CNF (1.2% w/vol) pentru a obține o concentrație de 0.25%, 0.5% si respectiv 1% w/w GO în suspensia de CNF (*concentratia finala de GO raportata la masa de polimer in faza continua). Gelatina metacrilata

(GelMA, derivata din peste) (8% w/w) cu DM= 20% a fost adăugata in amestec și lăsată să se dizolve sub agitare magnetică la 37°C. Apoi a fost adăugat GGMA o concentrație de 2% w/w in amestec și dizolvată la 37°C timp de 15 minute. Solutiестock de fotoinitiator LAP (Lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinate) a fost preparată la 25mg/ml și adugată in formulare într-oconcentrație de 0.3% wt/vol.

Tabel 2. Descrierea formularilor printabile.

Ink cod Ink compozitie	GG_000	GG_025	GG_050	GG_100
GG-MA (%)	2	2	2	2
GelMA (%)	8	8	8	8
GO (%)	/	0.25	0.5	1

Evaluarea proprietatilor mecanice. Răspunsul mecanic al hidrogelurilor a fost investigat prin experimente de compresiune uniaxială (analizor de textură CT3 Brookfield). Eșantioanele de testare au fost obținute prin turnare in matrita sub forma de cilindri de 10 mm și o înălțime de 3 mm și reticulate folosind radiație UV (365nm). Eșantioanele au fost analizate in triplicat prin comprimarea până la o deformare de 100%. S-a observat că adaugarea de GO nu îmbunătățește rezistența la compresiune atunci când este adaugată într-un procent de 0.25%, însă la un procent mai mare rețeaua polimerică devine cu mult mai elastică. Acesta poate fi un indiciu că GO inhibă procesul de reticulare in bulk ducând la obținerea unor rețele mult mai elastice.

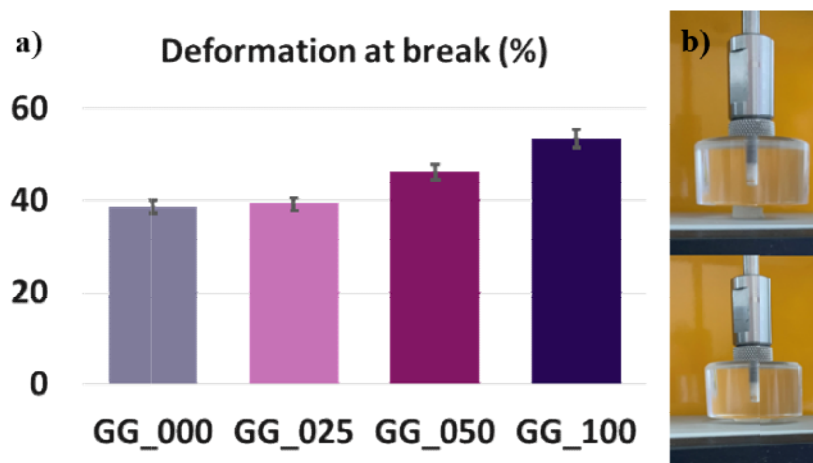


Fig.2. Testele de compresiune până la rupere pentru eșantioanele pe baza de GelMA și GG cu și fără GO (a); fotografiile în timpul testelor de compresiune (b).

Evaluarea proprietatilor de rehidratare. Cinetica si gradul de gonflare a fost evaluat in PBS conform protocolului descris in (2). Experimentele au fost efectuate în triplicat în aceleași condiții și au fost raportate valorile medii. Proprietățile de rehidratare si capacitatea de absorbtie de mediu apos ale hidrogelurilor multicomponente au fost studiate luând în considerare in principal concentratia de GO. Astfel, s-a observat ca cresterea continutului de grafena creste capacitatea de gonflare, toate esantioanele atinand echilibrul dupa 4h cu exceptia probelor cu 1%GO care ating gradul maxim dupa 6h. Hidrogelurile obtinute prezintă o capacitate mare de gonflare, si se observa ca adăugarea de GO in procent de 1% impacteaza semnificativ capacitatea de gonflare a materialelor inducand o crestere semnificativa a valorilor

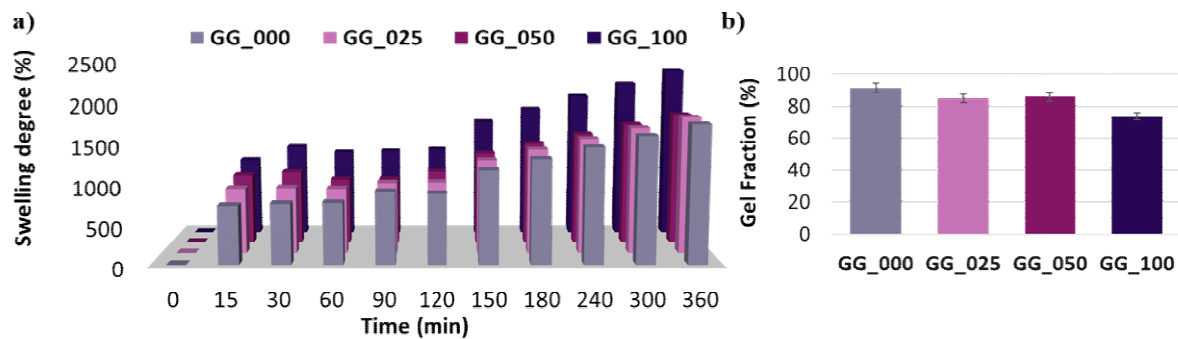


Fig. 3. Cinetica de gonflare (a) si gradul maxim de gonflare (b) in PBS ale probelor pe baza de GelMA si GG cu si fara GO.

Evaluarea proprietăților de degradare in prezenta de colagenază. Comportamentul de degradare in vitro al hidrogelurile nanocomposite au fost studiate folosind metoda descrisa în(3) cu mentiunea ca s-a utilizat o soluție de colagenază de concentratie 120 U/ml. Fig. 4. Descrie rezultatele studiului de degradare in vitro a hidrogelurile nanocompozite pentru o perioada de 7 zile. S-au observant diferențe semnificative ale comportamentului la degradare a materialelor în funcție de compoziția acestora, prezența oxidului de grafena generand un grad mai scăzut de degradare a sistemelor nanocompozite. Odata cu creșterea conținutului de GO în amestecurile de reacție inițiale, scade si gradul de degradare. Rezultatele obținute sugereaza ca materialul multicomponent cu doar 0.25% GO în formulare a prezentat o valoare reziduală GF de 34% la sfârșitul experimentului de degradare (7 zile). Aceasta valoare corespunde unei degradari aproape totale a componentei proteice. Nivelul de degradarea enzimatică a tuturor materialelor studiate a fost în acord cu compoziția, unde s-a observant clar că rata de degradare este mai mică atunci când este prezent un conținut mai mare de GO.

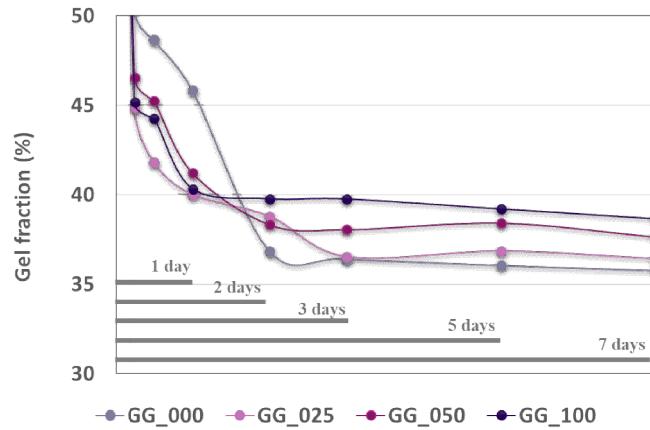


Fig. 4. Cinetica de degradare in vitro a hidrogelurilor pentru o perioada de 7 zile.

Fabricarea de structuri simple si multimaterial/hibride prin printare 3D. Evaluarea printabilitatii materialelor a fost efectuata folosind procesul de printare pe bază de microvalva si extrudare directa (bioprinter 3D Discovery RegenHU). Procesul de printare a structurilor 3D a fost desfasurat la 37 °C pentru toate formulările. Toate cele 4 formulari au fost testate si optimizate pentru cele doua tehnologii de printare. S-a observat ca ink-urile formeaza filament continuu (Fig.7a) atat utilizand procesul de printare pe bază de microvalva si extrudare directa. Parametri optimi pentru printare sunt prezentati tabelar.

Tabel 1. Parametri optimi pentru printareutilizand tehnologie bazate pr micro-valva

Ink	Pressure (kPa)	Feed rate (mm/s)	Valve openingtime, VOT (μ s)	Valve closingtime, VOT (μ s)	Dosingdistance(μ s)	Printingdelay (ms)
GG_000	40 \pm 1	10	1000	1500	0.1	0
GG_025	40 \pm 4	10	1000	1800	0.1	0
GG_050	40 \pm 5	10	1000	2200	0.1	100
GG_100	40 \pm 8	10	800	2200	0.1	150

Tabel 2. Parametri optimi pentru printareutilizand extrudare directa

Ink	Pressure (kPa)	Feed rate (mm/s)	Printingdelay (ms)
GG_000	55 \pm 1	10	0
GG_025	55 \pm 4	12	0
GG_050	60 \pm 5	12	50
GG_100	60 \pm 8	15	100

Software-ul BioCAMTM (Versiunea 1.0, RegenHU) a fost utilizat pentru a genera fișierul G-code/protocolul de printare proiectate sub forma de structuri cubice cu l=10 mm in 5 straturi in care

alterează două tipuri de umplere, tip fagure (3) și tip rectilinar (2) (Fig 5.b) Structurile 3D au fost depuse pe plăci de sticlă utilizând o microvalvă tip contact (CF300 ID = 0,3/S = 0,1) și ac cu diametrul interior de 0,3 mm (CF300 ID = 0,3/L = 2,4) iar pentru extrudare directă ac cu diametrul de 0.25 (G25 – ac cilindric cu lungime de 6.25). Structurile 3D au reticulate prin expunerea fiecărui strat la UV (365 nm) timp de 5s. Toate cele 4 formulări au generat structuri 3D cu fidelitate ridicată din punct de vedere calitativ (Fig. 5.c).

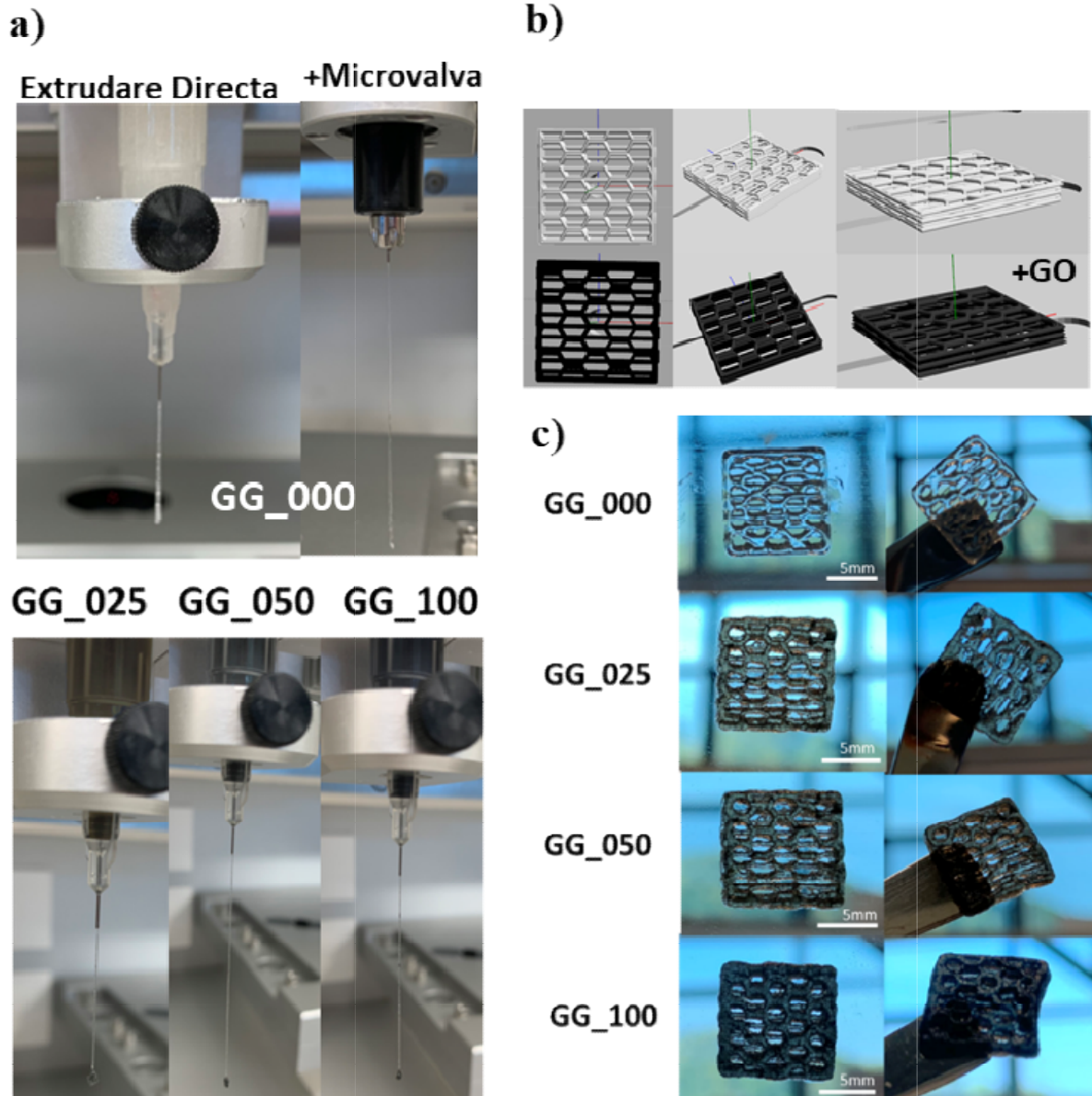


Fig 5. Fotografii ale filamentului generat prin extrudarea formulării martor (Extrudare directă stanga-sus și extrudare prin microvalvă dreapta-sus) și a formulărilor nanocompozite (extrudare directă stanga-jos) (a); Model CAD (b); Structuri printate 3D (c).

Obținerea de structuri multimaterial/hibride folosind succesiv doua formulari diferite a fost efectuată folosind procesul de printare pe bază de microvalvă pentru printarea straturilor cu GG_000 și extrudare directă pentru printarea straturilor cu formulari nanocompozite. Modelul CAD utilizat a fost similar cu cel descris anterior cu mențiunea că straturile cu umplere timp fagure sunt printate cu GG_000 iar straturile rectilinii cu formulare ce conține GO (Fig. 6a). Au fost obținute formulări cu o excelentă rezoluție de printabilitate, mai ales considerând dimensiunile mici și complexitatea detaliilor proiectate. Din punct de vedere calitativ, structurile redau cu fidelitate modelul proiectat și prezintă integritate structurală (Fig. 8 b).

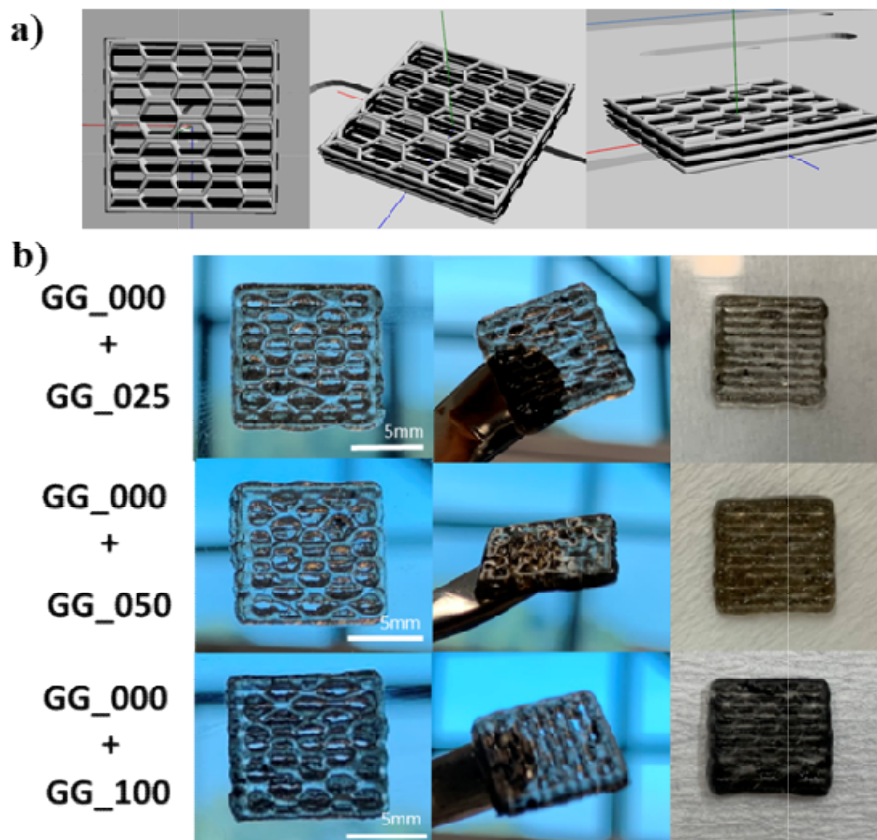


Fig. 6. Modelul CAD (a) și fotografiile ale structurilor multimaterial printate 3D (b).

Evaluarea cantitativă a printabilității formulărilor obținute s-a realizat prin măsurarea diametrului filamentului depus și a ariei porilor folosind ImageJ software. S-a observat că formulările GG_025 și GG_050 prezintă valori foarte apropiate de cele obținute pentru modelul teoretic, ceea ce indică faptul că structurile prezintă o fidelitate structurală excelentă. În plus, s-a observat că printabilitatea se îmbunătățește atunci când structurile sunt printate utilizând două formulări. În particular, valorile obținute pentru structurile multimaterial GG_000+GG_050

indica faptul ca aceasta metoda de fabricare duce la obtinerea de structuri 3D cu cel mai inalt grad de fidelitate.

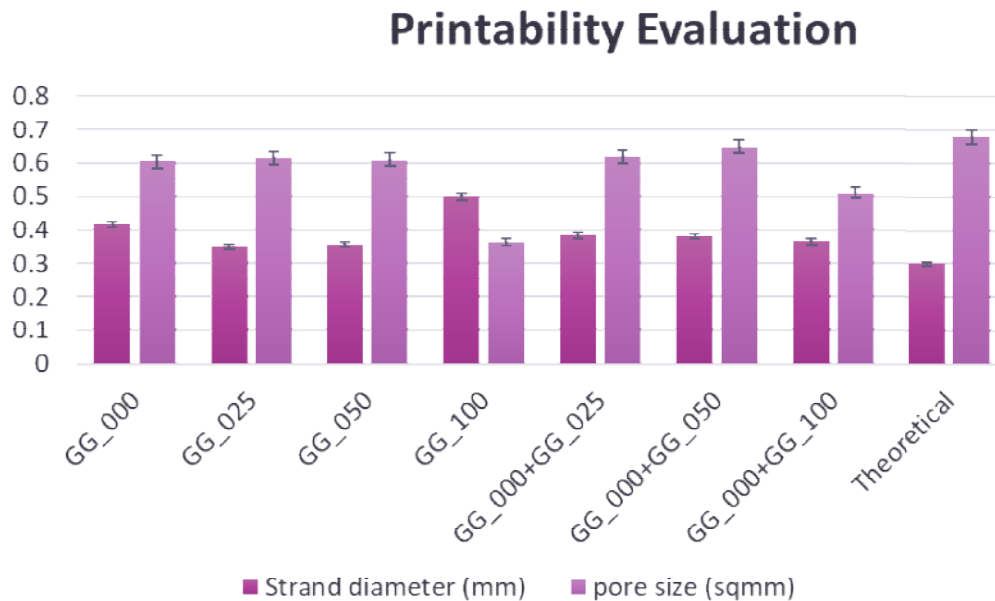


Fig. 7. Evaluarea cantitativa a printabilitatii prin masurarea dimensiunii filamentului si a porilor in comparatie cu modelul teoretic.

Evaluarea proprietatilor morfologice. Echipamentul de tomografie micro-computer de înaltă rezoluție Bruker CT 1272 a fost utilizat pentru a efectua examinarea morfologică a probelor. Morfologia probei selectate împreună cu analiza dimensiunilor porilor sunt descrise în fig 9. Analiza micro-CT a suporturilor 3D liofilizate a dovedit o structură foarte poroasă, interconectată, cu pereți subțiri. Analiza efectuată pe GG_000+GG_050 a arătat că porii ocupă aproximativ 80% din volumul total al suportului, în timp ce dimensiunea medie a porilor a variat de la $30 \pm 3,2$ până la $750 \pm 55,9$ μm , cei mai mari pori fiind cei pre-proiectați în modelul 3D. S-a observat că doar o parte din structura cuprinde pori pre-proiectați ceea ce indică un colaps parțial al structurii ce a avut loc fie înainte sau în timpul procesului de liofilizare.

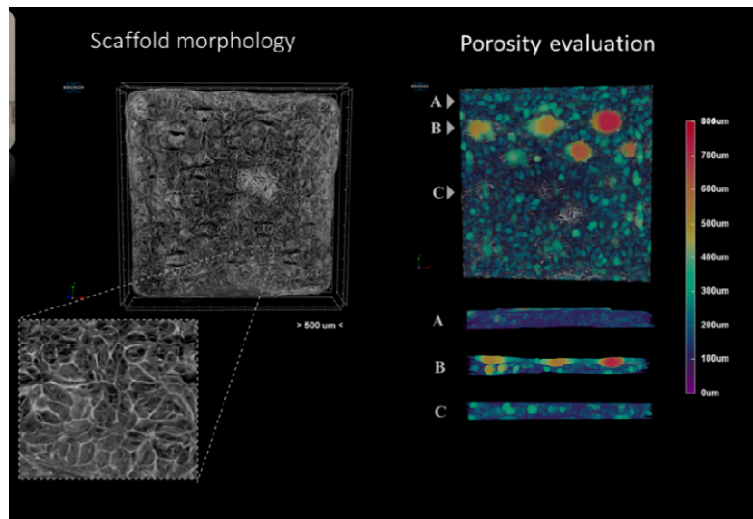


Fig. 9. Morfologia probei GG_000+GG_050 împreună cu analiza dimensiunilor porilor.

Îndeplinirea cu succes a principalelor obiective tehnice va genera publicații în jurnale de top, prezentări la evenimente internaționale care vizează diseminarea, informarea și susținabilitate prin Proprietatea Intelectuală generată și creșterea vizibilității internaționale a cercetării științifice românești.

Un alt sistem studiat este a fost formularea caragenan-gelatina și formulări nanocompozite pe baza de caragenan-gelatina și oxid de grafenă (GO) principalele rezultate obținute sunt prezentate schematic mai jos. Obiectivul principal al studiului este de a investiga influența concentrației de oxid de grafenă (GO) în hidrogeluri obținute din kappa-caragenan (κC) și gelatina de pește reticulate cu genipin. Proteinele și polizaharidele joacă numeroase roluri în sistemele lor biologice native. Abordările biomimetice în ingineria tisulară se bazează, de obicei, pe amestecuri de proteine-polizaharide cu bioactivitate crescută derivată din sinergia celor doi compuși. În matricea extracelulară (MEC) a țesuturilor animale, faza proteică dominantă este potentată de o fază minoritară de natură polizaharidică, dar cu o implicație remarcabilă în ceea ce privește suportul mecanic și a semnalizarea celulară. Prin urmare, în proiectarea amestecurilor, selectarea materialelor complementare adecvate este crucială pentru producerea unei arhitecturi complexe care să reproducă hidrofilicitatea, sarcinile de suprafață, structurarea matricei artificiale, etc. Amestecurile propuse sunt concepute astfel încât κC să aibă atât rolul de susținere mecanică al rețelei, cât și de componentă osteomodulatoare activă biologic, datorită asemănării structurale cu constituenții de tip glicozaminoglicani (GAG) ai MEC din oase și cartilajul uman. GO este, de asemenea, cunoscut drept un factor care stimulează osteogeneza, în virtutea a două motive, biocompatibilitatea intrinsecă (din punct de vedere chimic) și asigurarea unor stimuli micromecanici (domenii rigide distribuite uniform în matrice) detectabili de celule.

Caracterizarea rețelelor propuse este orientată spre identificarea asemănărilor dintre formulările proiectate și MEC a tesutului osos nativ.

Sinteza formularilor simple / compozite. S-au sintetizat 6 formulări, obținute într-un volum final de 100 ml în care concentrația totală de polimer de 5% m/v și raportul masic κ -caragenan: gelatină de pește este menținut constant la 1:3. Conținutul de oxid de grafena [cGO] a fost variat exponențial pe baza ecuației

$$cGO [\%] = 1.25x,$$

unde $x = \{\pm 7,5, \pm 3,75, 1\}$ și reprezintă procente masice raportate la masa totală de polimer. Dispersiile de oxid de grafena au fost obținute în apă dublu distilată (30 ml fiecare). Gelatina de pește a fost dizolvată în dispersiile GO sub agitare constantă timp de 2 ore la 40 ° C. Soluțiile de κ -caragenan (70 ml fiecare) au fost obținute prin dizolvarea pulberii până la solubilizarea complete și obținerea unei soluții limpezi, la 70 ° C. Soluțiile de κ -caragenan au fost răcite la 50 ° C pe o baie de apă și amestecate cu soluțiile de gelatină de pește-GO sub agitare puternică timp de 1 oră, la 50 ° C. După omogenizarea soluțiilor, a fost adăugat genipinul iar omogenizarea acestuia a fost asigurată prin continuarea agitării mecanice timp de 30 de minute. Tabelul 1 rezumă compoziția celor 6 formulări.

Tabelul 1. Compoziția formularilor dublu-ranforsate

Proba	Gelatina de pește [g]	κ -caragenan [g]	Oxid de grafena [mg]	Genipin [mg]
fG κ C	3.75	1.25	0	0.03
fG κ C_GO1	3.75	1.25	0.009	0.03
fG κ C_GO2	3.75	1.25	0.022	0.03
fG κ C_GO3	3.75	1.25	0.063	0.03
fG κ C_GO4	3.75	1.25	0.115	0.03
fG κ C_GO5	3.75	1.25	0.267	0.03

Gradul de gonflare. Studiile de gonflare au fost demarate pentru a determina capacitatea amestecurilor sintetizate de a absorbi apă. Esantioanele au fost cântărite și imersate în 5 ml soluție tampon fosfat (PBS, pH 7,4) la temperatura camerei. La intervale regulate, probele au fost îndepărtate din mediul de incubare și cântărite după îndepărtarea excesului de apă.

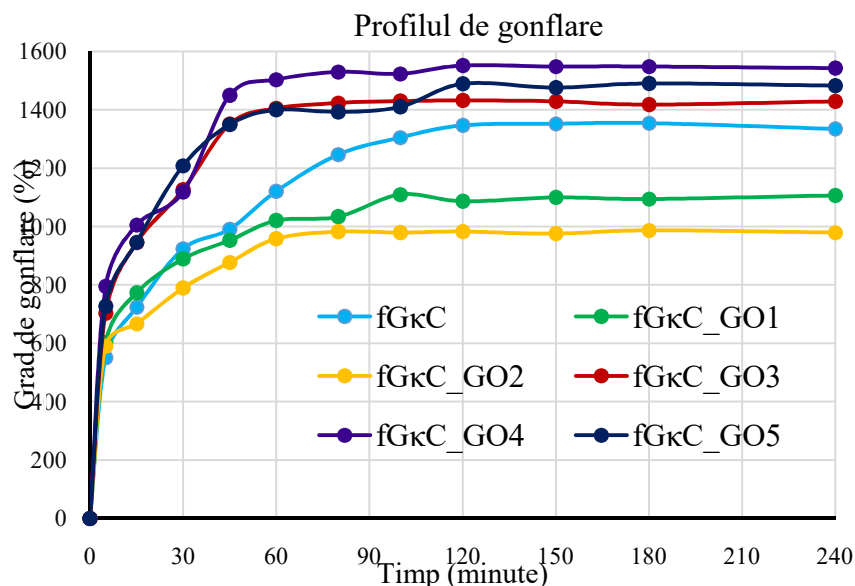


Figura 10. Profilul de gonflare a celor 6 formulări pe baza de gelatina de peste și k-caragenan ranforsate cu oxid de grafenă.

Transferul de nutrienți și metaboliți către celulele care populează un scaffold sunt influențate semnificativ de capacitatea de gonflare. Comportamentul de gonflare al formulărilor fGkC deriva direct din structura super-poroasă a hidrogelurilor. Deoarece porii sunt interconectați și funcționează ca un sistem capilar, materialele absorb cantități semnificative de apă încă din primele minute de la imersare. Toate formulările ating echilibrul în mai puțin de două ore de la imersie și absorb de la 8 până la 15 ori greutatea lor inițială. Aceste constatări se corelează cu studiile calitative și cantitative de μ CT care au arătat o interconectivitate crescută a porilor în probele ranforsate cu GO, în particular la concentrații mai mari de 1,25% m/m. Acest fenomen este cauzat de faptul că GO permite modelarea unei rețele de macro și micro-canale, asigurând mai multă infiltrare a fluidelor.

Studiul de degradare enzimatică. Esantioane liofilizate de dimensiune egală (15 mg) au fost incubate în 3 mL soluție tampon Tris-HCl (0,1 M, pH 7,4) îmbogățită cu 0,005% (m/v) NaN_3 și 5 mM CaCl_2 timp de 1 oră. După, 1 mL de soluție de colagenază (15 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a fost adăugat peste mediul în care esantioanele erau incubate. Testul a fost efectuat la 37 °C pe câte trei esantioane pentru fiecare formulare sintetizată iar rezultatele obținute au fost mediate și raportate cu deviație standard. Degradarea probei a fost oprită prin inactivare chimică și termică după adăugarea a 0,5 ml de soluție 0,25 M de EDTA rece și răcire pe baie de gheață. După inactivarea colagenazei, probele au fost spălate cu Tris-HCl și apă distilată. Frația de gel (GF) a fost determinată după uscarea probei în aer la 37 °C utilizând următoarea ecuație

$$\text{GF} (\%) = (1 - W_{d,t} / W_0) \times 100,$$

unde $W_{d,t}$ este masa probei uscate dupa timpul t de expunere la solutia de colagenaza si W_0 este masa esantionului uscat inainte de incubare in solutia de enzima.

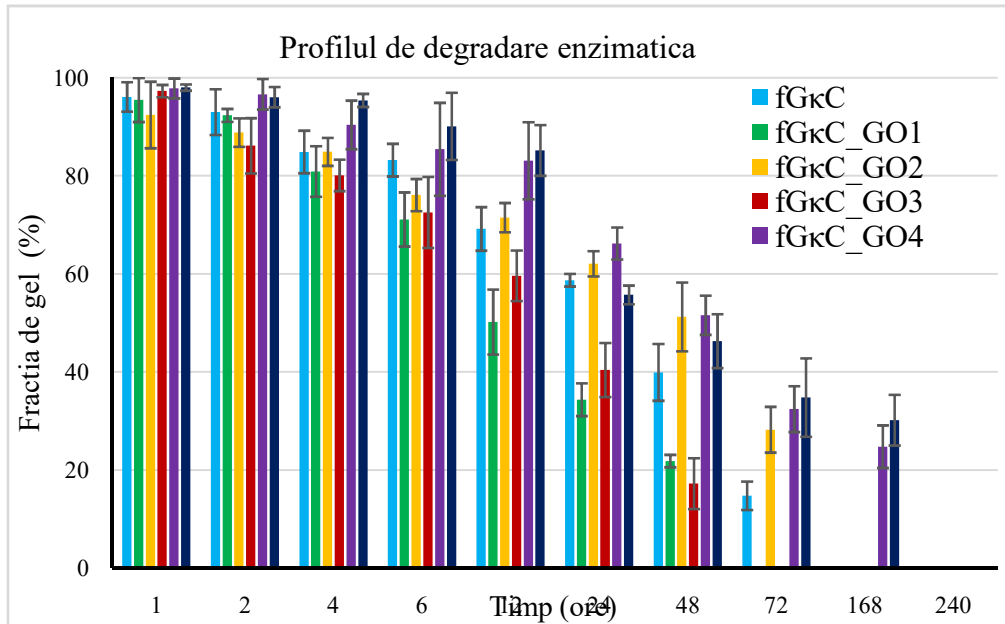


Figura 11. Fractia de gel a celor 6 formulari pe baza de gelatina de peste si k-caragenan ranforsate cu oxid de grafena dupa diversi timp de incubare in solutie de colagenaza

Investigarea stabilitatii materialelor in medii fiziologice complexe simulate a fost efectuata la 1/2/4/6/12/24 de ore, 2/3/7 si 10 zile. Cea mai rapida degradare apare in primele 6-12 ore pentru majoritatea formularilor, cu exceptia fGκC_GO4 si fGκC_GO5, unde pierderea masica nu depaseseste 20%. Cel mai probabil, aceasta pierdere abrupta se datoreaza indepartarii din retea a gelatinei de peste insuficient fixata de genipin. Stabilitatea imbunatatita a compozitiilor fGκC_GO4 si fGκC_GO5 poate fi pusa pe seama concentratiei ridicate de oxid de grafena care in reseaua hibrida, datorita grupurilor functionale care contin oxigen asigura formarea unor legaturi suplimentare de hidrogen, interactiuni care reprezinta contribuie la densificarea retelei. GO poate sa actioneze ca o bariera care sa incetineasca difuzia colagenazei in intreaga retea polimerica si astfel sa decelereze procesul de degradare. Totodata, profilul de degradare al celor 6 formulari se poate corela si cu caracteristicile morfologice ale materialelor la timpi mai mari de 3 zile de incubare, in sensul in care stabilitatea acestora poate fi diminuat de existent porilor de dimensiuni mari. La 7 zile, in compozitiile fGκC_GO4 si fGκC_GO5, fractia de gel este la valori comparabile cu fractia de caragenan initiala, iar la 10 zile toate probele sunt degradate 100%.

Microtomografie computerizata (μ CT). Tehnica de μ CT a fost utilizata pentru a caracteriza din punct de vedere calitativ si cantitativ morfologia unor esantioane liofilizate din cele 6 formulari. Analiza a fost efectuata utilizand echipamentul de înaltă rezoluție Bruker μ CT 1272 iar scanarea a fost efectuată fără filtru, tensiunea sursei a fost setată la 45 kV, intensitatea curentului la 200 μ A, în timp ce expunerea fost setată la 550 ms. Scanarea a fost efectuată cu un pas de rotatie de 0,15°, la o rotire a probelor de 180°. Fiecare captura 2D a fost rezultatul medierii a 3 achiziții. Pentru cele 6 probe, dimensiunea pixelului imaginii a fost fixată la valoarea de 7 μ m. In softul NRecon au fost reconstruite imaginile 3D ale probelor, in baza setului de date de tip radiografie 2D rezultat. In softul CTAn au fost efectuate analizele calitative ale probelor (porozitate, evaluarea dimensiunii porilor) precum si reconstructia porilor ca obiect pentru o mai buna intelegere a arhitecturii esantioanelor. Softurile CTVox si DataViewer au fost utilizate la ilustrarea tomogramelor reconstruite (proba solida/pori). Imagini reprezentative ale esantioanelor se regasesc grupate in Figura 12.

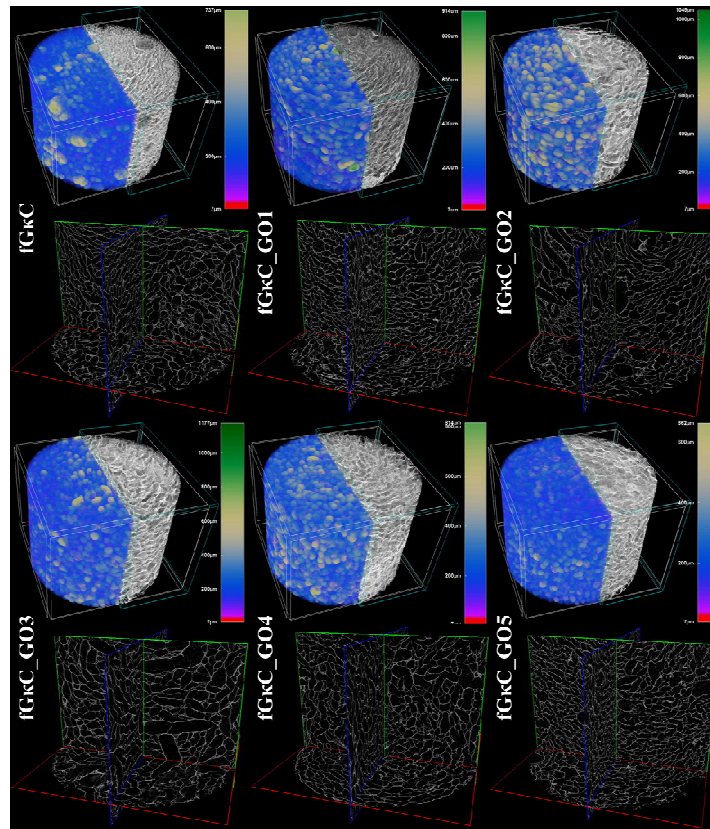


Figura 12. Capturi de ecran ale tomogramelor reconstruite si ilustrate in CTVox (figuri color) cupland porii reconstruiti ca obiecte peste structurile poroase ale esantioanelor si reprezentari ale intersectiilor planelor XY/XZ/ZY extrase din DataViewer (fuguri alb-negru).

Prin analiza de tomografie computerizata, a fost pusa in evidenta porozitatea esantioanelor liofilizate obtinute din cele 6 formulari, precum si caracterul interconectat al acestora. Co-vizualizarea tomogramelor obiectului si a porilor reconstruiti ca obiecte si ilustrati in coduri de culori in functie de diametrul acestora ofera o imagine de ansamblu a felului in care porii de diferite dimensiuni sunt distribuiti in volumul probelor. In particular, porii de dimensiuni sub 50 μm au o distributie omogena in probe, constituind o retea complexa, uniform structurata in volum, prin care aportul de nutrienti esential pentru celule poate fi asigurat. Interconectivitatea porilor, precum si dimensiunile variabile ale acestora in functie de continutul de GO al materialelor poate fi mai bine observant in capturile alb-negru din softul DataViewer.

II. Fabricarea inkurilor conductoare speciale pentru a afilia mecanisme de declanșatorii optime la anumite aspecte cheie: îmbunătățirea sensibilității substratului și a conductibilității electrice ridicate.

In vederea obtinerii de biosenzori primul pas a fost fabricarii inkurilor conductoare au fost considerate diferite specii de material carbonice (diferite specii de grafena exp. oxid de grafena (GO), nanotuburi de carbon cu pereti simpli (CNT) sau amestecuri ale acestora. Diferite concentratii au fost considerate: 0.3 mg/ml, 1mg/ml, 1.5 mg/ml si 2 mg/ml si au fost folosite pentru modificarea suprafetei electrozilor serigrafati pe baza de carbon cu GO, GO/CNT si nanoparticule de aur prin printare 3D

Pentru functionalizarea electrozilor serigrafati pe baza de carbon s-au utilizat dispersii de GO si SWCNT-COOH. Depunerea dispersiilor pe suprafata senzorului a fost efectuat folosind procesul de printare pe bază de microvalva tip contact (micro-valva: CF300 ID = 0.15/S = 0.06/ ac: CF300 ID:0.15/L-2.4)(bioprinter 3D Discovery RegenHU). Procesul de printare a fost desfasurat la temperatura camerei pentru toate formulările. Software-ul BioCAMTM (Versiunea 1.0, RegenHU) a fost utilizat pentru a stabili paternul de printare in 6 straturi si pentru a genera protocolul de printare.

Pentru stabilirea concentratiei optime de GO pentru printare au fost investigate 3 concentratii diferite: 0.3, 1, 1.5 si 2 mg/mL in apa distilata, si s-a observat ca suspensia cu un continut de 1 mg/mL genereaza depuneri continue si reproductibile in timp ce cresterea concentratiei de GO/CNT duce la cresterea vascozitatii amestecului si in consecinta la formarea de picaturi.

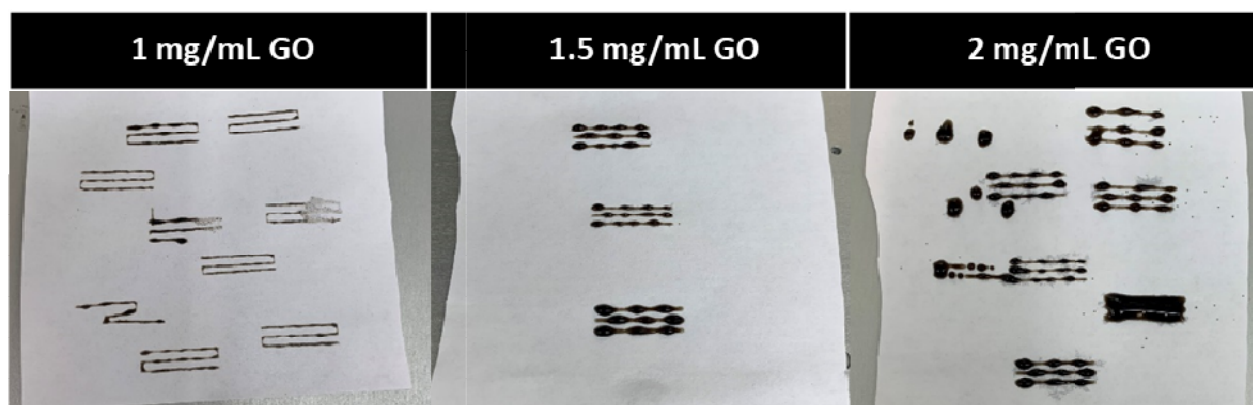


Fig 1. Teste de printabilitate si optimizare pentru suspensii de GO de concentratii diferite: 1, 1.5 si 2 mg/mL in apa distilata.

Parametrii de printare pentru suspensiile de GO (1 mg/mL in apa distilata) si CNT-COOH (2mg/mL in DMSO) au fost optimizati in urma testelor de printare si sunt prezentati in tabelul 1.

Tabel 1. Parametrii de printare pentru suspensiile de GO respectiv CNT-COOH.

Ink	Pressure (kPa)	Feed rate (mm/s)	Valve openingtime, VOT (μ s)	Valve closingtime, VOT (μ s)	Dosingdistance (μ s)
GO	10 \pm 2	25	800	1300	0.1
CNT-COOH	8 \pm 4	30	800	1500	0.1

Astfel, electrozii serigrafiați pe baza de carbon au fost funcționalizați cu GO/blank și GO/CNT. În Figura 2. sunt descrise pattern-urile pentru printare împreună cu fotografiile ale electrozilor serigrafiați pe baza de carbon pe care au fost depuse dispersie de GO și GO/CNT-COOH. Ulterior, aceștia au fost caracterizați electrochimic prin intermediul voltametriei ciclice (CV) și a spectroscopiei electrochimice de impedanță (EIS) cu scopul de a determina modificările produse în răspunsul electrochimic în urma fiecărei modificări. În cele ce urmează sunt descrise diferite modificări și este prezentat rezultatul asociat.

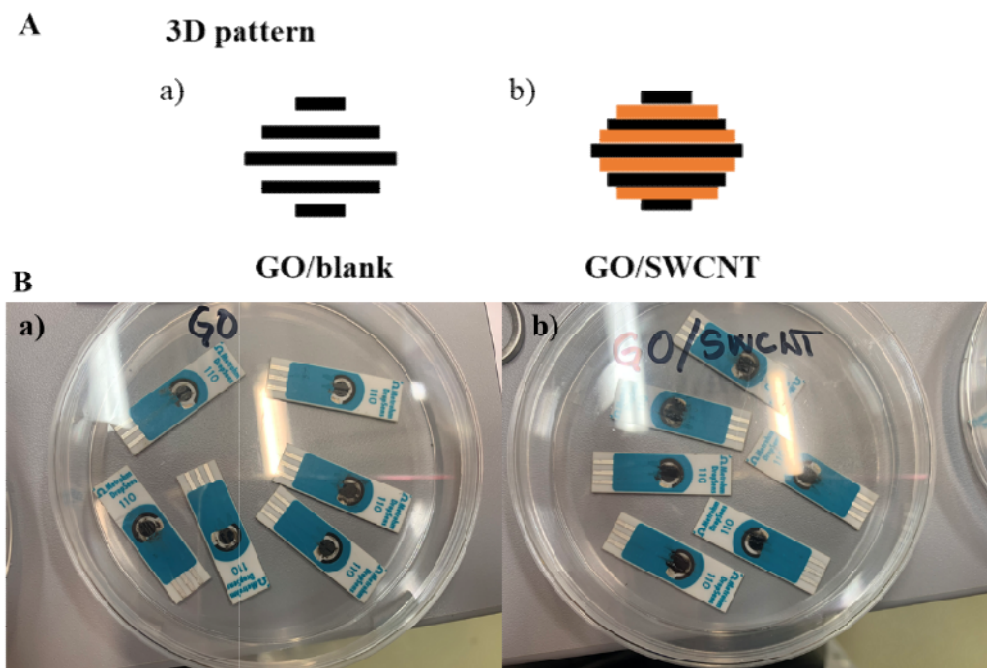


Fig2. A. Pattern 3D de modificare a electrozilor serigrafiați pe baza de carbon cu GO (a), și GO/CNT (b) și B. fotografii ale electrozilor pe care a fost efectuată depunerea de GO (a) și GO/CNT (b).

Primele teste au fost realizate pentru depunerea a unui monostrat de 0.3 mg/mL GO, oxid de grafena intercalat cu 0.3 mg/mL nanotuburi de carbon (CNT) și GO intercalat cu 5 mM nanoparticule de aur (AuNPs). Masuratorile electrochimice arată că modificarea cu GO (Figura 1 a) nu a produs o scădere semnificativă a conductivității, caracteristică specifică acestui nanomaterial. Masuratorile CV arată o ușoară scădere a intensității curentului (Figura 1 a), iar în EIS (Figura 1 b) se observă o creștere a rezistenței la transfer de sarcină (R_{ct}), însă rezultatele nu sunt comparabile cu rezultatele obținute prin alte metode de a modifica SPCE cu GO. În continuare a fost testat un electrod modificat cu GO și CNT (Figura 2) intermitent. În acest caz, intensitatea picurilor de curent scade semnificativ (Figura 2a), dar R_{ct} în EIS nu crește pe măsura scaderii intensității curentului (Figura 2b). În plus, introducerea CNT în sistem ar trebui să îmbunătățească conductivitatea electrică, prin urmare propunem efectuarea unor teste adiționale. În final, pe SPCE au fost depuse cu ajutorul imprimantei 3D dispersie GO intercalată cu AuNPs (Figura 3 a) pentru a verifica dacă astfel putem îmbunătăți conductivitatea electrozilor. Rezultatele obținute în acest caz arată că acest lucru nu s-a întâmplat, măsurând în CV (Figura 3a) o scădere a intensității picurilor redox și în EIS (Figura 3b) o creștere a semicercului caracteristic rezistenței la transfer de sarcină, ceea ce înseamnă că nu a fost îmbunătățită conductivitatea electrică a SPCE și mai multe teste trebuie efectuate.

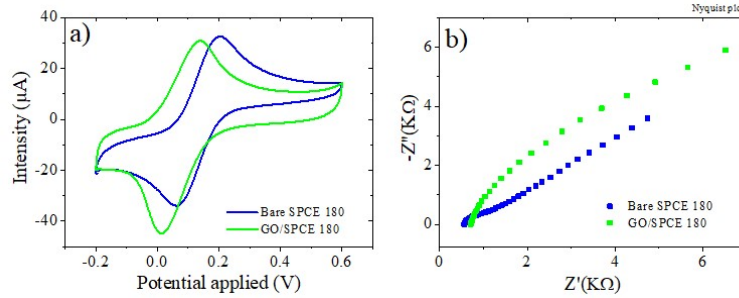


Figura 1. CV (a) si grafic Nyquist EIS (b) inregistrate in 1 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$, 0.1M KCl, pentru SPCE nemodificat si GO/SPCE.

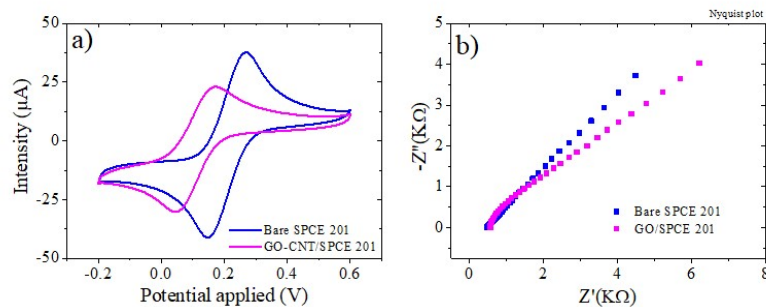


Figura 2. CV (a) si grafic Nyquist EIS (b) inregistrate in 1 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$, 0.1M KCl, pentru SPCE nemodificat si GO-CNT/SPCE.

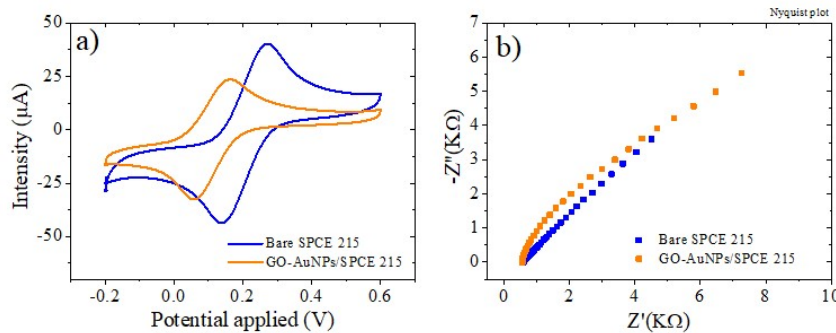


Figura 3. CV (a) si grafic Nyquist EIS (b) inregistrate in 1 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$, 0.1M KCl, pentru SPCE nemodificat si GO-AuNPs/SPCE.

Urmatoarele experimente au fost realizate pe doua seturi a cate sase SPCE. Primul set a fost modificat cu mai multe straturi de 2 mg/mL GO, in timp ce al doilea set a fost modificat cu mai multe straturi de GO alternat cu 2 mg/mL CNT. In primul rand, a fost verificata reproductibilitatea metodei de a depune GO pe electrozii serigrafati. In acest sens, s-au realizat masuratorile electrochimice ce

indica o buna reproductibilitate in CV (Figura 4a), cu o intensitate a picurilor de current relativ asemanatoare pentru toti cei 6 electrozi. In schimb, cu tehnica EIS (Figura 4b) s-au obtinut proprietati asemanatoare pentru SPCE 1 si SPCE 4, SPCE 3 si SPCE 8, respectiv SPCE 2 si SPCE 7, diferentele intre perechile de electrozi fiind semnificative atunci cand ne referim la rezistenta la transfer de sarcina.

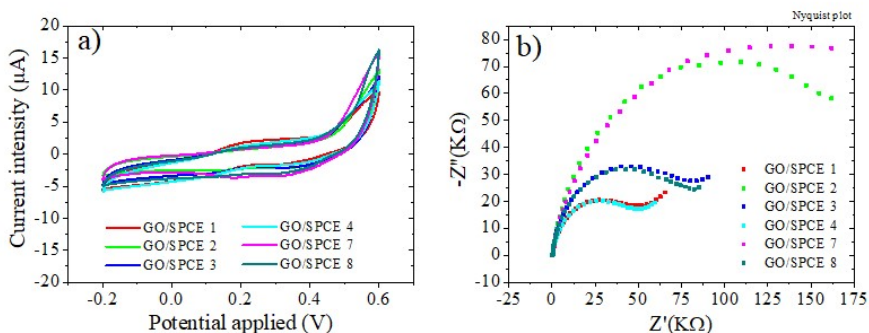


Figura 4. CV (a) si grafic Nyquist EIS (b) inregistrate in $1 \text{ mM } [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, 0.1 M KCl , pentru GO/SPCE 1, GO/SPCE 2, GO/SPCE 3, GO/SPCE 4, GO/SPCE 7, and GO/SPCE 8.

In continuare, electrozii au fost supusi unor modificari aditionale. In primul rand, pe un electrod modificat cu GO a fost imobilizat bioreceptorul, ce consta intr-o secventa monocatenara ADN (Figura 5). Rezultatele obtinute sunt promitatoare, astfel incat se observa in CV (Figura 5a) o scadere a intensitatii curentului dupa modificarea cu GO, si o crestere a conductivitatii si formarea din nou a picurilor de oxido-reducere dupa imobilizarea sondei ADN pe suprafata. Masuratorile EIS (Figura 5b) confirma rezultatele, aratand o crestere semnificativa a R_{ct} pentru GO/SPCE si o scadere majora a rezistivitatii dupa ce bioreceptorul a fost imobilizat. Desi schimbarile electrochimice sunt semnificative, adsorptia sondei ADN pe electrozi ar trebui sa blocheze conductivitatea electrica, AND-ul fiind o biomolecula de mari dimensiuni.

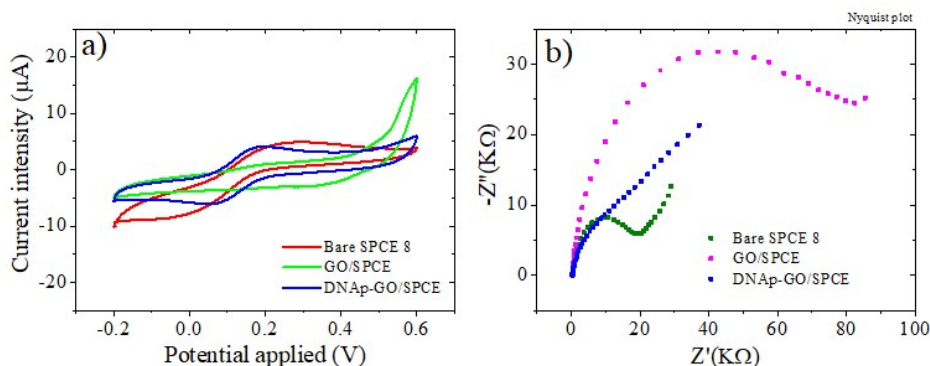


Figura 5. CV (a) si grafic Nyquist EIS (b) inregistrate in $1 \text{ mM } [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, 0.1 M KCl , pentru SPCE nemodificat, GO/SPCE si DNAP-GO/SPCE.

Un alt electrod din acest set a fost modificat cu GO prin printare 3D si redus electrochimic in vederea caracterizarii prin spectroscopie fotoelectronica de raze X (XPS). Reducerea s-a realizat prin aplicarea a zece cicluri CV in prezenta de clorura de potasiu, la un potential cuprins intre 0 si -1.5 V, cu oviteza de baleiere a semnalului de 0.1 V/s. Proprietatile electrochimice inregistrate pe acest electrod sunt caracteristice acestor modificari, aratand o crestere a picurilor de curent (Figura 6a) si o reducere semnificativa a semicercului din EIS (Figura 6b), ceea ce inseamna o rezistivitate la transferul de sarcina foarte scazuta.

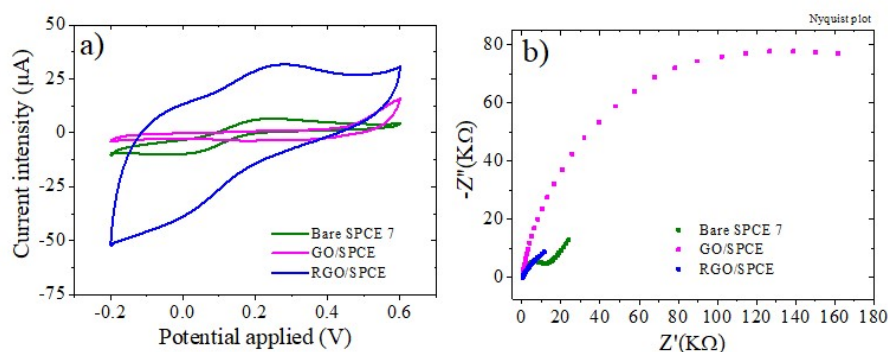


Figura 6. CV (a) si grafic Nyquist EIS (b) inregistrate in $1 \text{ mM } [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, 0.1 M KCl , pentru SPCE, GO/SPCE si RGO/SPCE.

In continuare, pe doi electrozi modificati cu GO si reduși electrochimic a fost imobilizata sonda ADN. In acest caz, reducerea electrochimica a GO a generat proprietati neobisnuite, anume o curba de voltametrie cu picuri nespecifice (Figura 7 a, Figura 8 a) si un grafic Nyquist (Figura 7 b, Figura 8 b) in care semicercul se formeaza, dar tinde sa formeze o bucla de inductie. Pe ambii electrozi se observa modificari in semnalul electrochimic dupa imobilizarea sondei AND, inasa rezultatele sunt dificil de interpretat din cauza buclei de inductie formata.

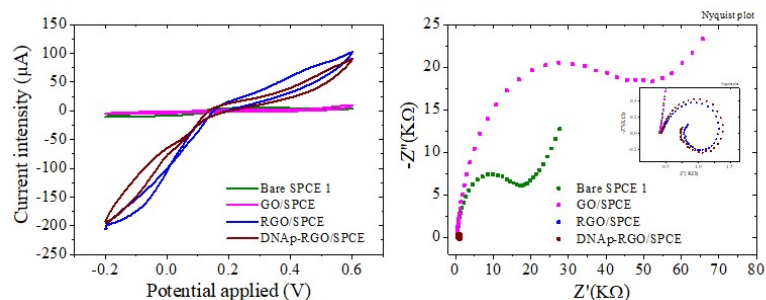


Figura 7. CV (a) si grafic Nyquist EIS (b) inregistrate in $1 \text{ mM } [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, 0.1 M KCl , pentru SPCE nemodificat, GO/SPCE, RGO/SPCE si DNAP-RGO/SPCE.

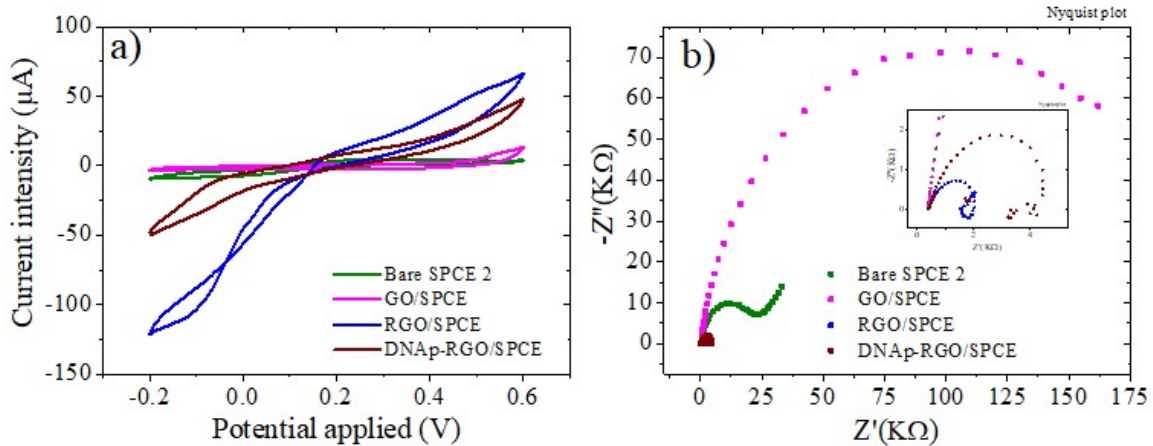


Figura 8. CV (a) si grafic Nyquist EIS (b) inregistrate in $1 \text{ mM } [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, 0.1 M KCl , pentru SPCE nemodificat, GO/SPCE, RGO/SPCE si DNAP-RGO/SPCE.

Alti electrozi modificati cu GO au fost redusi electrochimic si functionalizati cu nanoparticule de aur prin utilizarea metodei CV (aplicarea a cinci cicluri CV in prezenta de 0.5 mM acid sulfuric ce contine 5 mM acid clorauric, la un potential cuprins intre $+1$ si -1 V , cu o viteza de baliere de 0.05 V/s). In acest caz se observa din nou curbele de voltametrie carora le lipsesc picurile specifice procesului de oxido-reducere, mai ales dupa functionalizarea cu AuNPs (Figura 9 a, Figura 10 a), precum si formarea bulcelor de inductie in impedanta (Figura 9 b, Figura 10 b) dupa efectuarea pasului de reducere electrochimica. Cu toate acestea, se observa din nou schimbari majore in semnalul electrochimic dupa imobilizarea sondei monocatenare ADN pe electrodul de lucru, inasa aceste modificari sunt dificil de interpretat in aceste conditii. Mai multe teste sunt necesare pentru a formula concluzii corecte.

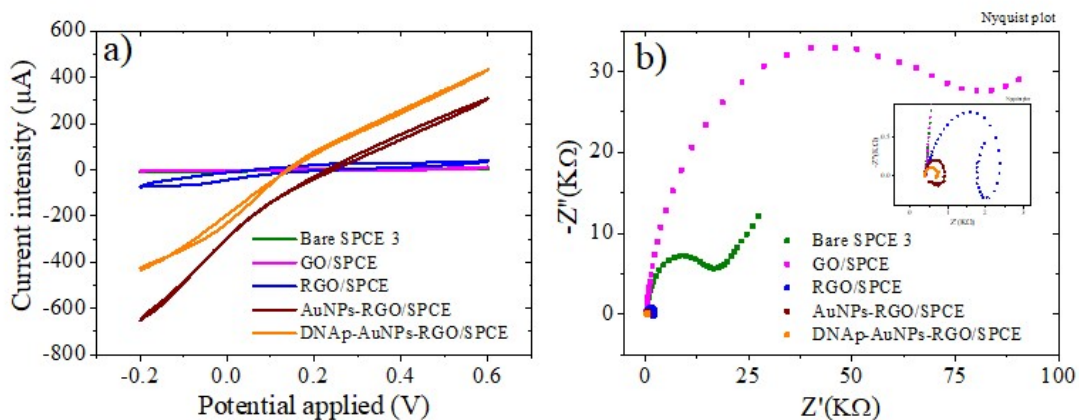


Figura 9. CV (a) si grafic Nyquist EIS (b) inregistrate in $1 \text{ mM } [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, 0.1 M KCl , pentru SPCE nemodificat, GO/SPCE, RGO/SPCE, AuNPs-RGO/SPCE si DNAP-RGO/SPCE.

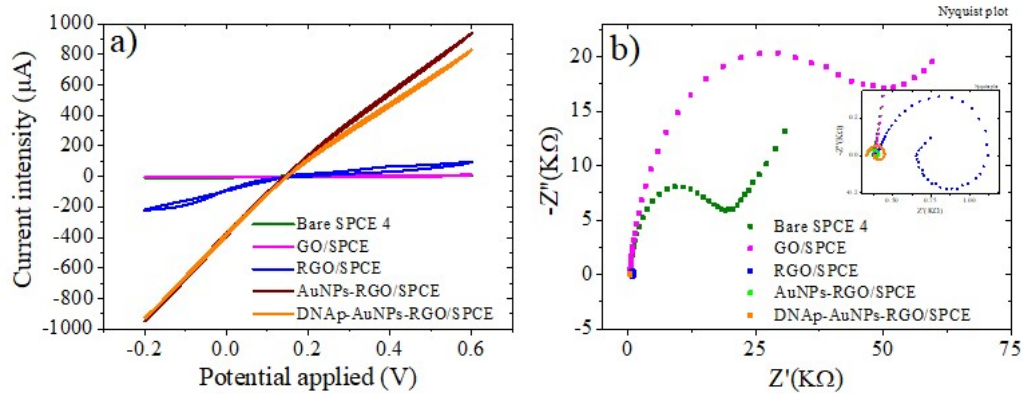


Figura 10. CV (a) si grafic Nyquist EIS (b) inregistrate in $1 \text{ mM } [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, 0.1 M KCl , pentru SPCE nemodificat, GO/SPCE, RGO/SPCE, AuNPs-RGO/SPCE si DNaP-RGO/SPCE.

Al doilea set de 6 electrozi a fost modificat prin intermediul printarii 3D cu mai multe straturi intercalate de 2 mg/mL GO si 2 mg/mL CNT. In acest caz, reproductibilitatea este mai scazuta decat in cazul modificarii doar cu dispersie GO, acest lucru fiind observat atat in CV (Figura 11 a), cat si in EIS (Figura 11 b), unde se pot vedea caracteristicile destul de diferite intre cei sase SPCE si obtinerea bulcelor de inductie in EIS pentru patru electrozi.

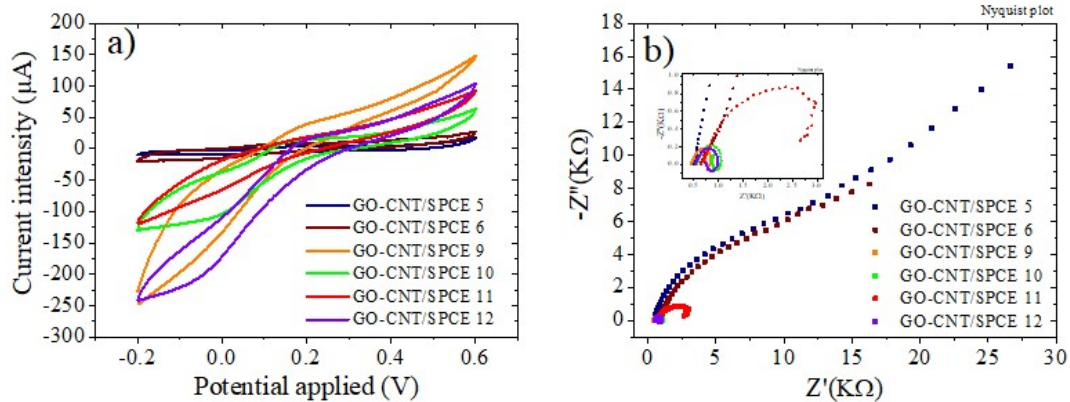


Figura 11. CV (a) si grafic Nyquist EIS (b) inregistrate in $1 \text{ mM } [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, 0.1 M KCl , pentru GO-CNT/SPCE 5, GO-CNT/SPCE 6, GO-CNT/SPCE 9, GO-CNT/SPCE 10, GO-CNT/SPCE 11 si GO-CNT/SPCE 12.

Un al experiment a vizat modificarea electrozilor cu GO-CNT, reducerea electrochimica si functionalizare cu nanoparticule de aur. In acest caz sunt obtinute din nou proprietati usor diferite in voltametrie, fiind observate in primul caz curbe CV carora le lipsesc picurile redox (Figura 16 a), in timp ce al doilea SPCE prezinta aceste caracteristici (Figura 17a). Proprietatile electrochimice determinate prin intermediul EIS de asemenea prezinta diferente intre cei doi electrozi, insa bucle de

inductie sunt obtinute dupa reducerea GO in ambele cazuri (Figura 16 b, Figura 17 b). Din nou sunt observate diferente semnificative in semnalul electrochimic dupa imobilizarea sondei pe electrozi, inasa mai multe teste si o reproductibilitate mai ridicata sunt necesare inainte de a formula concluzii clare.

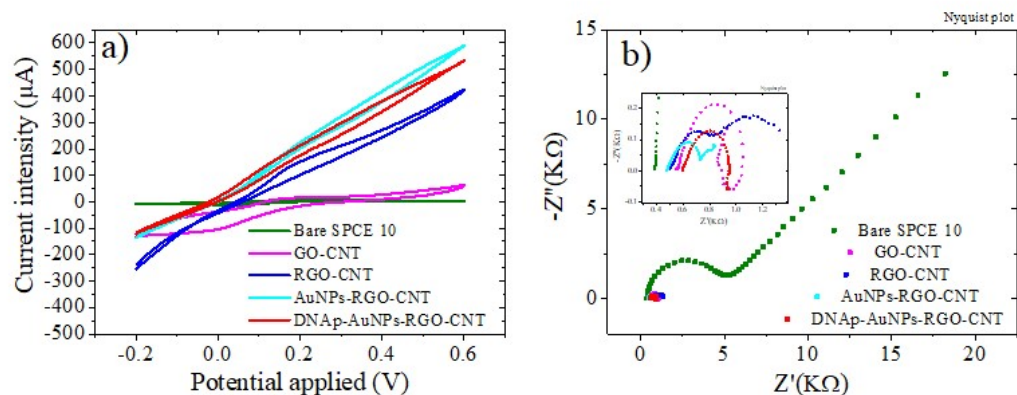


Figura 16. CV (a) si grafic Nyquist EIS (b) inregistrate in $1 \text{ mM } [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, 0.1 M KCl , pentru SPCE nemodificat, GO-CNT/SPCE, RGO-CNT/SPCE, AuNPs-RGO-CNT/SPCE, and DNAP-AuNPs-RGO-CNT/SPCE.

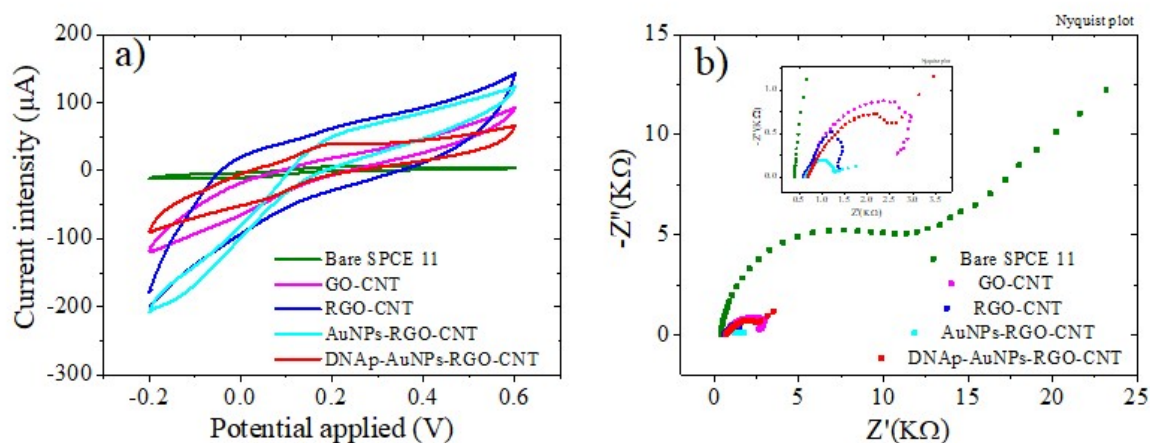


Figura 17. CV (a) si grafic Nyquist EIS (b) inregistrate in $1 \text{ mM } [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, 0.1 M KCl , pentru SPCE nemodificat, GO-CNT/SPCE, RGO-CNT/SPCE, AuNPs-RGO-CNT/SPCE, and DNAP-AuNPs-RGO-CNT/SPCE.

III. Concluzii

In aceasta etapa am realizat sinteza si caracterizarea de formulari printabile pe baza de gelatina metacrilata (GelMA), gellan metacrilat(GGMA) si formulari printabile nanocompozite pe baza de gelatina metacrilata (GelMA), gellan metacrilat(GGMA) si oxid de grafena (GO)

Un alt sistem studiat este a fost formularea caragenan-gelatina si formulari nanocompozite pe baza de caragenan-gelatina si oxid de grafena (GO) principalele rezultate obtinute sunt prezentate schematic mai jos.

De asemeni au fost fabricarea inkurilor conductoare speciale pentru îmbunătățirea sensibilității substratului și a conductibilității electrice ridicate in vederea obtinerii biosenzorilor, rezultatele sunt promitatoare dar protocolul de modificare a suprafetei necesita imbunatatiri.

Au fost inaintate spre publicare lucrarile cu titlul:

1. The current state of the art in gellan-based printing inks in tissue engineering, CARBOHYDRATE POLYMERS, 2022.
2. Double-reinforced fish gelatin composite scaffolds for osteochondral substitutes, Materials, 2022

Au fost prezentate la evenimente stiintifice lucrarile

1. Graphene-based nanomaterials for bone tissue engineering RICCCE 22, Romania, 7-9 Septembrie 2022, prezentare orala
2. Design of Graphene Oxide - Colloid composite hydrogels with controlled architecture and multifunctionality, RICCCE 22, Romania, 7-9 Septembrie 2022, poster.
3. Graphene based biomaterials: opportunities, perspectives, and challenges, BIOMMEDD2022, Romania, 20-22 Iulie 2022, prezentare orala-lucrare invitata.
4. 3D printing of multi-layered graphene oxide - hydrocolloid composite hydrogels, APMAS 2022, Turcia, 19-19 Octombrie, 2022, prezentare orala.

References:

1. Jongprasitkul H, Turunen S, Parihar VS, Kellomäki M. Two-step crosslinking to enhance the printability of methacrylated gellan gum biomaterial ink for extrusion-based 3D bioprinting. Bioprinting. 2022;25(September 2021).
2. Cernencu AI, Lungu A, Dragusin DM, Stancu IC, Dinescu S, Balahura LR, et al. 3D Bioprinting of Biosynthetic Nanocellulose-Filled GelMA Inks Highly Reliable for Soft Tissue-Oriented Constructs. Materials (Basel). 2021 Aug 27;14(17):4891.

3. Vlasceanu GM, Şelaru A, Dinescu S, Balta C, Herman H, Gharbia S, et al. Comprehensive Appraisal of Graphene-Oxide Ratio in Porous Biopolymer Hybrids Targeting Bone-Tissue Regeneration. Nanomater (Basel, Switzerland) [Internet]. 2020 Aug 1 [cited 2022 Nov 15];10(8):1–19. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32722040/>

Director proiect,

Dr. Ing. Mariana Ionita

