

RAPORT ȘTIINȚIFIC ETAPA II

KIT PENTRU REGENERARE OSOASĂ PERSONALIZATĂ; O STRATEGIE PENTRU VIITOR / TOOLBOX FOR PERSONALIZED BONE REGENERATION; TAILORING SOLUTIONS FOR TOMORROW [REOSTEOKIT]

PCE 103 / 2022

Obiectivul general al proiectului REOSTEOKIT este să ofere un kit pentru reconstrucție osoasă, care îmbina terapia eficientă din punct de vedere al costurilor și mult îmbunătățite față de soluțiile convenționale de tratament utilizate pentru restaurarea defectelor osoase și un dispozitiv fiabil de monitorizare în timp real a potențialului osteogenic al celulelor stem mezenchimale umane: o măsură cantitativă a formării de os. În vederea realizării obiectivului general al proiectului am definit 2 direcții de cercetare: Dezvoltarea de formulări printabile pe bază de grafena și optimizarea în vederea printării 4D a inkurilor / cernelurilor nanocompozite și fabricarea unui dispozitiv de tip biosensor electrochimic. Considerând prima direcție de cercetare în această etapă am vizat dezvoltarea de materiale compozite / formulări printabile reticulabile fotodinamice care prezintă atât proprietățile necesare pentru printare 3D / 4D dar și caracteristicile necesare unui material ideal pentru regenerare osoasă (proprietăți mecanice, degradabilitate, biocompatibile, proprietăți angiogene, antiinflamatoare, porozitate mare cu pori interconectați). În acest sens în Etapa 2 / 2023 (Activitățile A2.1 – A2.5) am avut în vedere perfecționare / modularea performanțelor seriei de inkuri / formulări printabile simple și compozite pentru fabricarea de substituenți osoși sau biosenzori. Au fost avansate inițial (în etapa anterioară) o serie de formulări de bază (gelatina metacrilată, gelatină metacrilată, sau caragenan) urmata de sinteza de inkuri / cerneluri nanocompozite prin adăugarea de oxid de grafen (GO) exfoliat corespunzător (diferite concentrații). În etapa de față s-au efectuat studii pentru îmbunătățirea proprietăților de printare și obținerea anizotropiei caracteristică țesutului osos.

Pentru sistemul compozit pe baza caragenan-gelatină și formulările nanocompozite pe baza de caragenan-gelatină și oxid de grafen (GO) rezultatele au fost foarte promițătoare (principalele rezultate obținute sunt prezentate schematic în raportul anterior) dar pe baza acestora în ETAPA II / 2023 a fost elaborată și publicată lucrarea cu titlul „Double-Reinforced Fish Gelatin Composite Scaffolds for Osteochondral Substitutes”, în jurnalul științific *Materials*. Lucrarea prezintă amestecuri compozite reticulate cu Genipin de gelatină de pește/kappa-caragenan (fG/κC) cu diferite concentrații de oxid de grafen (GO) pentru înlocuitori osteocondrali. Structurile rezultate au fost examinate prin micro-computer tomografie, studii de gonflare, degradări enzimatică, teste de compresiune, teste MTT, LDH și LIVE/DEAD. Analizele au arătat că amestecurile fG/κC reticulate cu genipin și ranforsate cu GO au o morfologie omogenă, cu dimensiuni ideale ale porilor de 200-500 μm pentru aplicații oase alternative. Aditivarea GO cu o concentrație de peste 1,25% a crescut absorbția de fluide. Degradarea completă a amestecurilor are loc în 10 zile, iar stabilitatea fracției de gel crește odată cu concentrația de GO. Modulele de compresie ale amestecului scad la început până când fG/κC GO 3%, care are cel mai slab comportament elastic, apoi prin creșterea concentrației de GO amestecurile încep să-și recapete elasticitatea. Studiile de viabilitate celulară pe celulele MC3T3-E1 au indicat celule mai puțin viabile odată cu creșterea concentrației de GO. LDH

împreună cu testele LIVE/DEAD raportează o concentrație mare de celule vii și sănătoase în toate tipurile de amestecuri.

Tot în această Etapa au fost studiate și biomateriale și compoziții noi în vederea obținerii unor formulări care îndeplinesc cerințele regenerării țesutului dar și parametrii de printare. În acest sens cercetarea noastră s-a concentrat pe dezvoltarea de noi formulări printabile folosind o matrice polimerică gelatină/metacrilată / pectină/metacrilată (GelMa) / pectină (PeMA) care integrează componente de ranforsare sinergică, oxid de grafenă (GO) și fibre de nanoceluloză oxidată (CNF). Folosind tehnologia de printare 3D au fost create cernelurile compozite pe baza biomaterialelor menționate mai sus, scaffolduri asemănătoare matricei extracelulare a țesutului osos. Scaffoldurile 3D au fost printate cu succes folosind formulări cu concentrații variate de GO (0,25, 0,5 și 1% în raport de masă cu conținutul de polimer). Adăugarea de GO la hidrogel a îmbunătățit nu numai modulul de compresie, ci și printabilitatea și fidelitatea schelei comparativ cu sistemul coloid-gelatină/pectină pură. Datorită potențialului său pentru bioprintare 3D, formularea care conține 0,5% GO se dovedește a avea cele mai mari perspective pentru modelele de țesut osos și aplicații de inginerie țesutulară. Rezultatele au fost analizate și interpretate, și prezentate în detaliu într-o lucrare științifică cu titlul "3D double-reinforced graphene oxide – nanocellulose biomaterial inks for tissue engineered constructs" publicată în jurnalul științific RSC Advances [2] și sunt prezentate pe scurt în cele ce urmează. Obținerea de formulări printabile și influența GO. Pentru a studia influența conținutului de GO au fost preparate formulări printabile de diferite concentrații conform Tabelului 1.

Tabel 1. Descrierea formulărilor printabile

Ink code	GelMA (% w/w)	PeMA (% w/w)	CNF (% w/vol)	GO (% w/w)
GPC_000	8	2	1.2	0
GPC_025	8	2	1.2	0.25
GPC_050	8	2	1.2	0.5
GPC_100	8	2	1.2	1

^a With respect to polymer concentration.

Formularile printabile din Tabelul 1 au fost testate din punct de vedere reologic în printării 3D (depunere prin injecție) dar au fost realizate și teste fizicochimice și morfo-structurale și s-au efectuat teste *in vitro* și de asemenea au fost demarate și testele *in vivo*. Rezultatele sunt raportate în extensor în lucrare cu titlul "3D double-reinforced graphene oxide – nanocellulose biomaterial inks for tissue engineered constructs" publicată în jurnalul RSC Advances [2]. Fabricarea de structuri simple și multimateriale/hibride prin printare 3D și evaluarea printabilității materialelor a fost efectuată folosind procesul de printare pe bază de microvalvă și extrudare directă (bioprinter 3D Discovery RegenHU). Procesul de printare a structurilor 3D a fost desfășurat la 37 °C, parametrii de printare sunt prezentați în Tabelul 2 iar formulările printate în figura 1. Integritatea formei scaffoldului fabricat 3D este mai probabil să fie păstrată dacă filamentele de cerneală sunt continue, are o formă netedă și au o grosime constantă. Astfel, înainte de printarea 3D a scaffoldului, au fost efectuate teste experimentale pentru a determina parametrii optimi de procesare (prezentați în tabelul 2) și depunere. Când se utilizează imprimarea prin contact (cap de imprimare bazat pe tehnologia cu microvalve), procesul de imprimare este controlat în primul rând de timpul de deschidere a supapei (VOT) și de timpul de închidere a supapei (VCT), unde este necesară o presiune minimă. Cu toate acestea, sunt încă necesare presiuni pneumatice mai mari pentru depunerea cernelurilor cu vâscozitate mai mare. În această studiu, combinăm

presiunea cu VOT extins/ VCT pentru a optimiza procesul de imprimare la cele mai scăzute presiuni pt fiecare compoziție, astfel încât presiunea aplicată să fie sub valorile care ar afecta comportamentul celulelor.

Tabel 2 Parametri optimi pentru printare printare utilizand tehnologie bazate pr micro-valva

Ink code	Pressure (kPa)	Feed rate (mm/s)	Valve opening time, VOT (μ s)	Valve closing time, VCT (μ s)	Dosing distance (μ s)	Printing delay (ms)
GPC_000	35 \pm 5	10	800	1800	0.1	0
GPC_025	30 \pm 2	10	1000	1800	0.1	100
GPC_050	35 \pm 4	10	1000	2500	0.1	100
GPC_100	35 \pm 2	10	800	2500	0.1	100

Atât GelMA și PeMA nu prezintă, singure, suficientă recuperare la forfecare pentru a susține depunerea stratului secvențial, iar rolul CNF este de a ajuta printabilitatea. Schelele 3D au fost imprimate aplicând presiuni în intervalul de 30–35 kPa. Se poate observa că cea mai mică presiune de extrudare a fost folosită la printarea cu GPC_025, de asemenea a prezentat cel mai mic stres de curgere. Prin comparație cu formularea de referință, la 0,5% și 1% GO nicio diferență semnificativă nu a fost observată. Un model 3D a fost proiectat pentru a evalua acuratețea cu care hidrogelurile compozite pot fi printate, iar imaginile structurilor 3D imprimate simple și compozite cu vedere de sus și vedere laterală sunt prezentate în Fig 1A. Evaluarea vizuală arată o rezoluție bună de printare pentru toate formulările cu suficientă stabilitate structurală pentru a păstra forma și modelul pre-proiectat. O evaluare calitativă indică faptul că GPC_000 prezintă o rezoluție de printare foarte bună, totuși, prin comparație, formulările încărcate cu GO depășesc calitatea printării. Evaluarea cantitativă a printabilității formulărilor obținute s-a realizat prin măsurarea diametrului filamentului și a ariei porilor folosind ImageJ software și s-a observat că formulările nanocompozite prezintă valori foarte apropiate de cele obținute pentru modelul teoretic, ceea ce indică faptul că structurile prezintă o fidelitate structurală excelentă, iar datele sunt prezentate pe larg în lucrarea [2] și Figura 1 B-C.

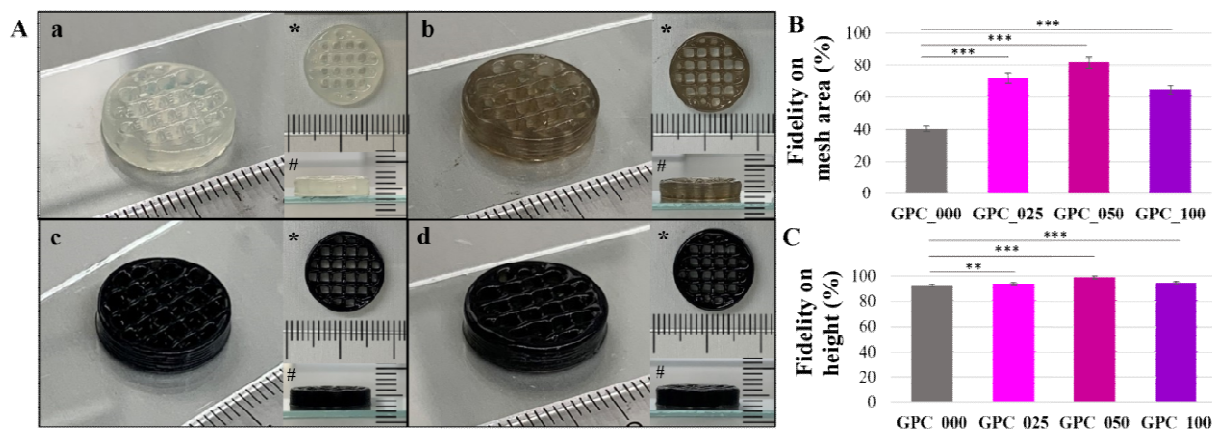


Figure 1. Imaginile formularilor simple și nanocompozite (A, a-GPC_000, b-GPC_025, c-GPC_050, d-GPC_100), discuri cu diametrul de 15 mm, 10 straturi (*) vedere de sus (#) vedere din lateral. Evaluarea cantitativă a printabilității prin măsurarea dimensiunii filamentului și a porilor în comparație cu modelul teoretic (B-C)

Evaluarea proprietatilor morfologice de suprafata si volum a fost efectuata cu echipamentul de tomografie micro-computer de înaltă rezoluție Bruker CT 1272. Analiza micro-CT a suporturilor 3D liofilizate a dovedit o structură foarte poroasă, interconectata, cu pereți subțiri (vezi Figura 2) promitatoare pentru regenerare tisulara.

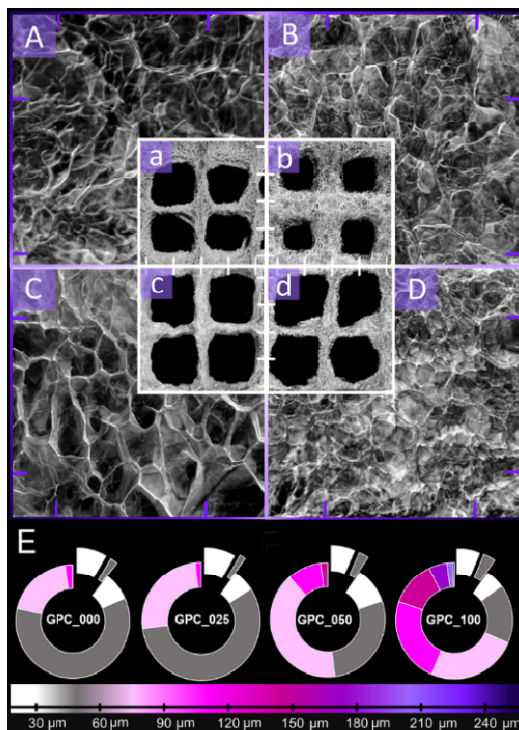


Figura 2. Imaginile MicroCT prezinta morfologia reprezentativă a probelor 3D în secțiune transversală de aproape (A. GPC_000, B. GPC_025, C. GPC_050 și D. GPC_100), în timp ce inserțiile (a – d) ilustrează suprafața a patru- grile pătrate ale rețelei de umplere. Bara de scala (distanța dintre două marcaje) este de 1 mm pentru ambele mărituri. E. secțiunea inferioară ilustrează analiza cantitativă a dimensiunii porilor din proba scanată.

Am efectuat teste celulare pentru evaluarea biocompatibilitatii materialelor. Suporturile 3D au fost evaluate cu fibroblastele L929 pe parcursul unei săptămâni de cultură in vitro în condiții standard. Rezultatele testelor de biocompatibilitate au arătat o biocompatibilitate generală bună a tuturor compozitelor studiate. Viabilitatea celulară și proliferarea au fost evaluate cantitativ utilizând bromură de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT) (Fig 3a). După o săptămână de cultivare, celulele cultivate în contact cu schelele imprimare 3D au prezentat un grad ridicat de proliferare. Dintre compozitele testate, materialul GPC_100 a prezentat o viabilitate semnificativ mai mare ($p < 0,001$) comparativ cu cele cultivate în contact cu martorul GPC_000. Citotoxicitatea biomaterialelor a fost cuantificată folosind testul LDH după 2 zile și 6 zile de cultură (Fig 3b). Toate compozitele au avut un nivel scăzut de citotoxicitate după 2 zile de cultură în condiții standard. La șase zile după însămânțare, nivelurile de LDH eliberat au fost ușor crescute pentru toate materialele testate. Dintre compozitele testate, GPC_100 duce la cele mai scăzute niveluri de eliberare de LDH, evidențiind citocompatibilitatea ridicată a acestui

material. În plus, testul Live/Dead a confirmat rezultatele cantitative MTT și LDH, evidențiind un raport pozitiv între celulele vii (verzi) și cele moarte (roșii) (Figura 3c).

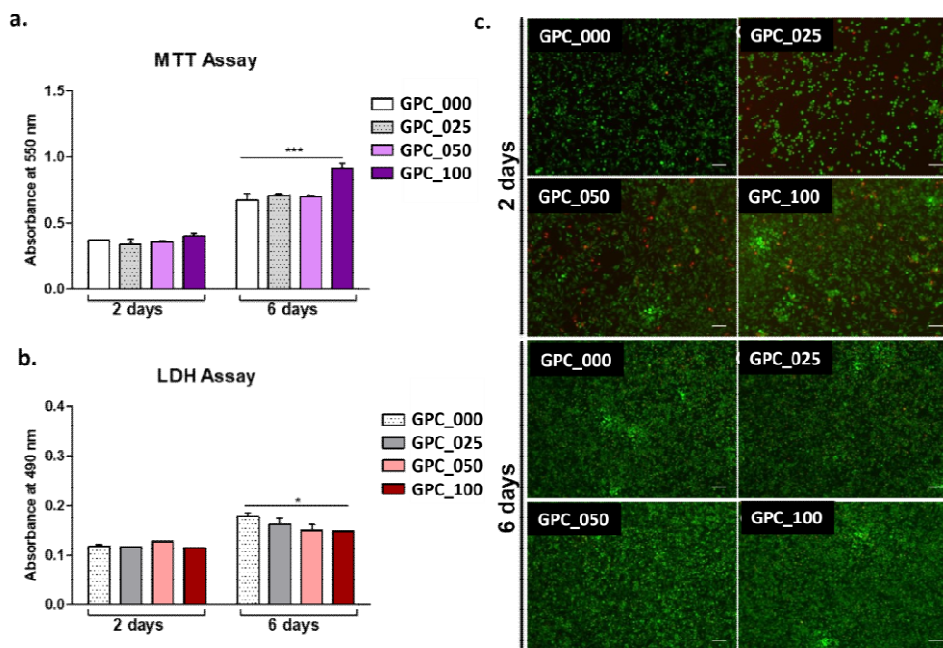


Figura 3. Evaluarea biocompatibilității scaffoldurilor 3D cu fibroblaste murine L929 (a) Viabilitatea celulară în contact cu schele prin test MTT după 2 și 6 zile de cultură; (b) Citotoxicitatea GPG la contactul cu fibroblastele L929 prin analiza LDH după 2 și 6 zile de cultură; (c) Testul LIVE/DEAD al fibroblastelor L929 după 2 și 6 zile de cultivare; bară de scala-100 μm . * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ prin 2-way ANOVA, post-test Bonferroni.

Putem spune ca materiale nanocompozite prezinta proprietăți emergente remarcabile, studiul nostru este primul care raportează formulări printabile pe baza de biomateriale și dublă armare cu GO/CNF. Performanța materialelor este influențată semnificativ de parametri precum reologia, porozitatea, gonflarea, caracteristicile mecanice și biologice, am anticipat că abilitățile de fotoreticulare ale PeMA și GelMA, împreună cu bioactivitatea inerentă a GelMA și stabilitatea PeMA, ar permite fabricarea de rețele hibride imprimabile cu perspective pentru ingineria țesutului osos. Datele reologice experimentale publicate in [2] arată că adăugarea de CNF la precursorii de printare conferă o caracteristică de forfecare - subțiere tuturor formulărilor. Curbele de vâscozitate publicate in [2] arată că atunci când conținutul de GO crește, există o tendință spre o creștere a vâscozității. Ca urmare a caracterizării reologice, am putut obține descrieri cantitative ale comportamentului de curgere a hidrogelurilor. GO are o influență importanta in ceea ce priveste, stresul de curgere și indicele de consistență, iar prin creșterea cantității de GO nu rezultă o creștere liniară a acestor valori. Din aceste motive, o concentrație de 0,5% GO în formularea sugerează existența unor interacțiuni optime între componente care contribuie la dezvoltarea stabilă a rețelei. Pentru a evalua precizia cu care hidrogelurile compozite pot fi imprimate, s-au fabricat schele 3D și s-a constatat că toate formulările au fost capabile să producă suporturi cu rezoluție și stabilitate structurală adecvată pentru a păstra forma

și modelul pre-proiectate. Analiza cantitativă a permis o comparație mai precisă a performanței de imprimare a diferitelor formulări, arătând că o concentrație de 0,5% GO stabilește interacțiuni la interfața componentelor, îmbunătățind considerabil rezoluția de printare în ceea ce privește fidelitatea pe suprafața rețelei și pe înălțime. Conform rezultatelor testelor de compresie efectuate pe schele poroase imprimate 3D, prin creșterea cantității de GO crește, de asemenea, efortul necesar pentru a obține aceeași deformare pentru fiecare probă. Testele de gonflare au reflectat în mod clar că încorporarea GO are ca rezultat producerea unei rețele de polimeri cu rigiditate crescută și că prezența GO ar duce la un grad mai scăzut de degradare a sistemelor nanocompozite. Morfologia hidrogelurilor compozite a prezentat o porozitate ridicată cu o distribuție uniformă a dimensiunii porilor la uscare prin congelare, unde pereții mai groși par să apară pe măsură ce concentrația de GO crește. Experimentele de citocompatibilitate au demonstrat un nivel general adecvat de biocompatibilitate în toate formulările care au fost investigate cu celulele MC3T3-E1, viabilitatea celulară, proliferarea crescută având loc atunci când concentrația de GO este mai mare de 0,5%.

Tot în această etapă am avut în vedere fabricarea altor formulări printabile pe bază de alginat de sodiu și oxid de grafenă (GO) cu fidelitate de printare înaltă. Combinarea alginatului de sodiu cu GO, reprezintă o strategie viabilă în formularea materialelor compozite cu proprietăți îmbunătățite față de cele ale componentelor individuali. Totuși, obținerea suporturilor printate 3D pe bază de alginat de sodiu și GO cu arhitectură controlată și fidelitate înaltă de printare reprezintă o provocare majoră, din cauza tendinței de aglomerare a straturilor de GO, respectiv proprietăților de printare limitate a precursorului, ceea ce determină obținerea unor suporturi printate 3D cu reproductibilitate redusă, arhitectură imprevizibilă și geometrie variată. Astfel în ETAPA II de implementare a proiectului a fost dezvoltată o metoda de pregătire a precursorului prin care se asigură gradul de dispersie a GO, iar vâscozitatea sistemului, factorul de bază care influențează direct proprietățile de printare ale materialului (capacitatea acestuia de a forma și menține o structură predefinită, a fost optimizată). Având în vedere complexitatea și specificul țesuturilor naturale, am reușit să obținem suporturi printate 3D pe bază de alginat de sodiu și oxid de grafenă cu fidelitatea formei și reproductibilitatea și geometrie controlată pentru aplicații personalizate în ingineria tisulară. Suporturile 3D pe baza de alginat de sodiu și oxid de grafenă au fost pe deplin caracterizate structural, morfologic, mecanic, abilitățile de printare și fidelitatea formei, precum și proprietățile reologice ale precursorilor investigați. Rezultatele au fost analizate și sunt subiectul unei cereri de brevet înaintată către OSIM cu titlul „Procedeu de obținere a unor suporturi printate 3d pe bază de alginat de sodiu și oxid de grafenă; protocolul de sinteză a formulării printabile și procesul de printare” și nr de înregistrare A/00728/23.11.2023.

O altă activitate științifică a fost dedicată obținerii de nanoparticule de chitosan sau fibre electrofilate funcționalizate cu biomolecule capabile să declanșeze angiogeneza. Particulele de chitosan după dispersare au prezentat morfologie sferică cu dimensiuni cuprinse între 1÷3μm și fără aglomerări (figura 4).

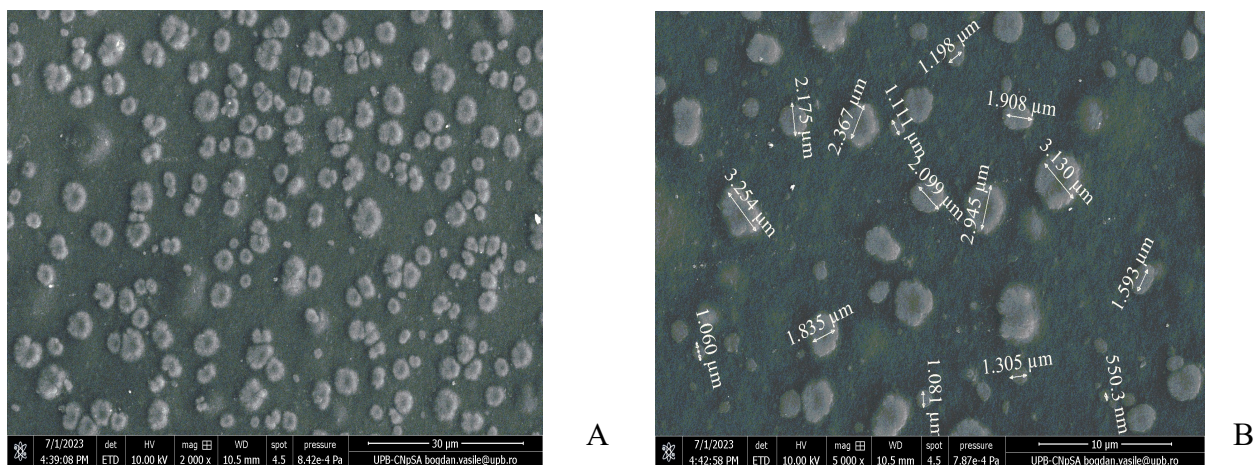


Figura 4. Morfologia particulelor de chitosan (A) magnificatie 2000x si (B) magnificatie 5000 x

Pentru fabricarea fibrelor electrofilate s-a folosit o solutie de chitosan (CS) de concentratie 3% (m/v). Ulterior, se prepara o solutie de polietilenoxid (PEO) de concentratie 3% (m/v) in apa distilata, la temperatura de 80°C, in conditii de agitare continua, pana cand PEO se solubilizeaza complet. Apoi, cele doua solutii de polimeri se amesteca in raport masic de 3/7 CS/PEO. Procesul de electrofilare s-a realizat folosind un echipament de electrofilare cu climat controlat (IME Technologies) (figura 5A). Distanța dintre varful acului si colector a fost de 15 cm, debitul solutiei a fost de 4 µL/min, iar voltajul aplicat a fost setat intre 16-18 kV. Acul s-a miscat cu viteza de 3 mm/s, iar colectorul s-a rotit cu viteza de 150 rotatii/min.

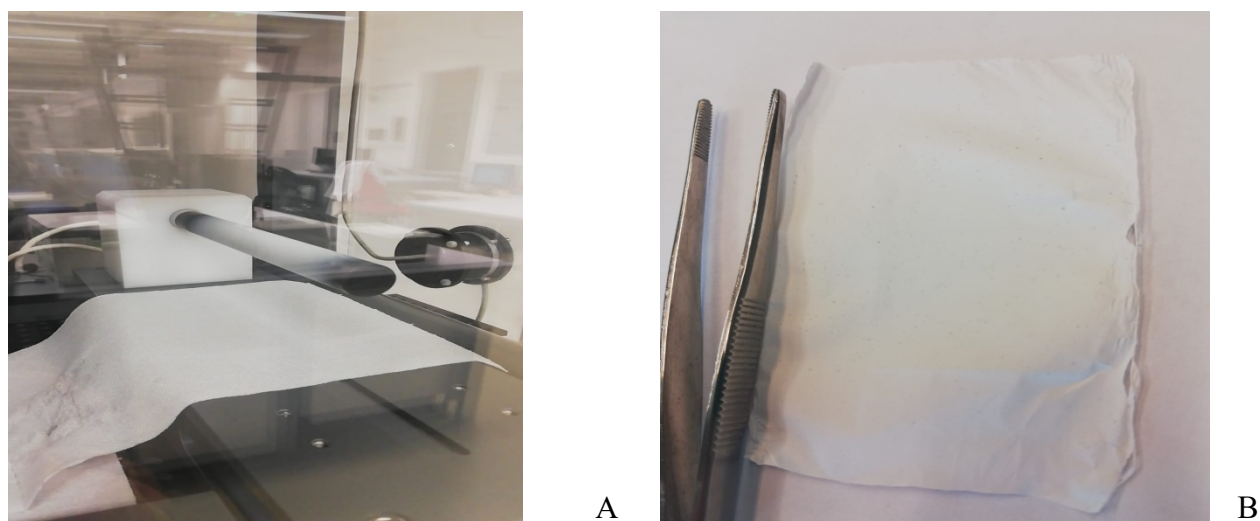


Figura 5. Procesul de electrofilare cu echipamentul (IME Technologies) (A) si membrane de nanofibre obtinuta prin procesul de electrofilare pe baza de polietilenoxid si chitosan (B).

Proba a fost electrofilata folosind ca parametri de mediu, temperature camerei (25°C) si umiditate relativa de 35%. Membranele electrofilate (figura 5B) obtinute au fost taiate in forme dreptunghiulare cu dimensiunea de 30 mm × 10 mm si plasate intr-un recipient acoperit continand o solutie apoasa de glutaraldehida de 50%. Probele au fost suspendate in vapori de

glutaraldehyda timp de 3 ore, apoi au fost imersate in apa distilata si tinute timp de 3 zile, pentru a elimina glutaraldehyda reziduala. Membranele nanofibroase reticulate si spalate au fost uscate in cuptor la 37°C timp de 2 ore. Dupa uscare membranele au fost mojarate si functionalizate necovalent cu VEGF si vor fi folosite la fabricarea unor formulari printabile care induc angiogeneza.

In prima etapa a proiectului am avut de semeni in vedere dezvoltarea formulărilor printabile de baza (inkuri / cerneluri); inkuri conductoare pe baza de grafena pentru biosenzori. In ETAPA II am identificat parametri optimi pentru printarea cu formularele dezvoltate anterior pe baza de material grafenice (GMs), au fost modificati electrozii serigrafiați (SPCE) prin printare 3D și a urmat o etapa de caracterizare atat electrochimica cat si structural si morfologica iar electrozii cei mai promitatori au fost functionalizati cu biomarkerii specifici procesele de osteogeneza si testati prin cuantificarea evenimentului de legare aptamer-analit astfel parcurgand activitati stiintifice specifice Activitatii 2 din Planul Realizarea si am efectuat experimente aferente subactivitatilor A2.6-A2.9.

In vederea modificarea suprafetei electrozilor serigrafiați pe baza de carbon cu GO prin printare 3D o serie de 20 electrozi serigrafiați pe baza de carbon (SPCE) au fost modificati cu 0.5 mg/mL oxid de grafena (GO), obtinand pe suprafata carbonica diferite modele (eng. patterns) cu scopul de a studia care este cel mai eficient pentru fabricarea platformei de detectie electrochimica. Au fost realizate cu succes trei modele diferite de acoperire a SPCE cu GO. Pentru functionalizarea electrozilor serigrafiați pe baza de carbon s-au utilizat dispersii comerciale de GO (0.5 mg/mL). Depunerea dispersiilor pe suprafata senzorului a fost efectuata folosind procesul de printare pe bază de microvalva tip inkjet (CF300 ID = 0.3/S = 0.1) (bioprinter 3D Discovery RegenHU). Software-ul BioCAM™ (Versiunea 1.0, RegenHU) a fost utilizat pentru a stabili patternul de printare (Fig. 6 a, b si c) si pentru a genera protocolul de printare. Procesul de printare a fost desfasurat la temperatura camerei pentru toate tipurile de pattern folosind urmatorii parametri de printare: presiune – 12kPa, deschiderea/inchiderea valvei - 500/300μs si viteza de printare – 25 mm/s. Astfel, electrozii serigrafiați pe baza de carbon au fost functionalizati cu GO, in 3 straturi.

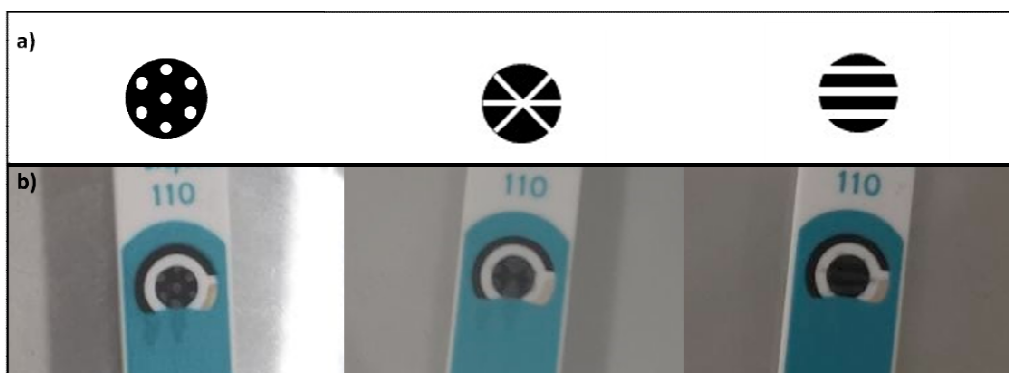


Figura 6. Pattern D de modificare a electrozilor serigrafiați pe baza de carbon cu GO (a) si fotografii ale suprafetelor pe care a fost efectuata depunerea de GO (b).

Toti cei 20 electrozi au fost supusi unui tratament electrochimic preliminar inainte de a fi modificati cu GO. Astfel, SPCE spalati cu apa distilata si uscati au fost mai intai acoperiti cu 100

μL HCl (0.1 M) si s-au efectuat 5 cicluri voltametrie ciclica (CV), la un potential cuprins intre +0.5 si -1.5 V, cu o viteza de baleiere a semnalului de 0.05 V/s. In continuare, pe electrozii spalati si uscati au fost efectuate alte cinci cicluri CV in prezenta a 100 μL PBS, pH 7, la un potential negativ (de la 0 la -2 V), cu aceeasi viteza de baleiere. Acest proces imbunatateste caracteristicile electrochimice ale electrozilor comerciali, ducand la o intensitate a curentului mai mare si la o diferenta de potential scazuta, facilitand in acelasi timp modificarea ulterioara a acestora [1].



Figura 7. SPCE pe care au fost testati parametri de modificare cu formularea printabila pe baza de GO pentru fiecare model in parte.



Figura 8. SPCE modificati cu formularea printabila pe baza de GO – model 1 (P1).



Figura 9. SPCE modificati cu formularea printabila pe baza de GO – model 2 (P2).



Figura 10. SPCE modificati cu formularea printabila pe baza de GO – model 3 (P3).

Initial au fost testati mai multi parametri pana cand au fost determinate caracteristicile optime de obtinere a fiecarui model. In figura 6 sunt prezentati electrozii de test, ce au fost modificati cu GO dar pe care nu s-a obtinut modelul dorit. In figura 7 se regasesc toate tipurile de moficari, electrozii modificati cu ink pe baza de GO utilizand primul model (P1)- figura 8, figura 9 ilustreaza al doilea model (P2) de modificare aSPCE cu ink pe baza GO, iar modelul 3 (P3) utilizat pentru a modifica electrozii se observa in figura 10. Electrocul pe care s-a obtinut cel mai bun rezultat este evidentiat in fiecare imagine pentru fiecare set (fiecare set contine intre 4 si 5 electrozi identici).

In continuare, electrozii modificati au fost caracterizati electrochimic utilizand atat metoda voltametriei ciclice, ce masoara intensitatea curentului, cat si spectroscopia

electrochimica de impedanta (EIS), ce determina rezistenta la transfer de sarcina (Rct). Toate masuratorile electrochimice au fost efectuate in solutie de electrolit 0.1 M KCl ce contine 1 mM $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ (1:1) proba redox. Masuratorile CV au fost inregistrate la un potential cuprins intre from -0.2 V si +0.6 V, cu o viteza de baleiere a semnalului de 0.05 V/s. Spectrele EIS au fost inregistrate in domeniul de frecventa 0.01-10⁵ Hz, cu o amplitudine AC de 0.01 V si la the potential formal (0.2 V), determinat de pozitia picurilor de oxido-reducere din CV.

In Figura 11 sunt reprezentate curbele CV inregistrate in solutia de electrolit ce contine ioni de fier, pentru electrozii modificati cu ink pe baza GO dupa cele trei modele diferite: (a) modelul 1 (P1), (b) modelul 2 (P2) si respectiv (c) modelul 3 (P3). In toate cele 3 cazuri se observa o schimbare substantiala a semnalului electrochimic dupa modificarea SPCE cu suspensie GO. In primul caz (a), intensitatea curentului nu scade asa cum se observa la ceilalti doi electrozi (b, c), inasa creste curentul capacitiv si diferenta de potential dintre picurile de oxido-reducere (ΔE_p) scade comparativ cu electrodul nemodificat. SPCE modificati cu formularea printabila pe baza de GO dupa modelul 2, respectiv modelul 3, prezinta o scadere majora a intensitatii curentului, ceea ce indica o acoperire mai uniforma cu formularea printabila pe baza de GO, cel mai bun rezultat fiind obtinut pe modelul 2 (P2).

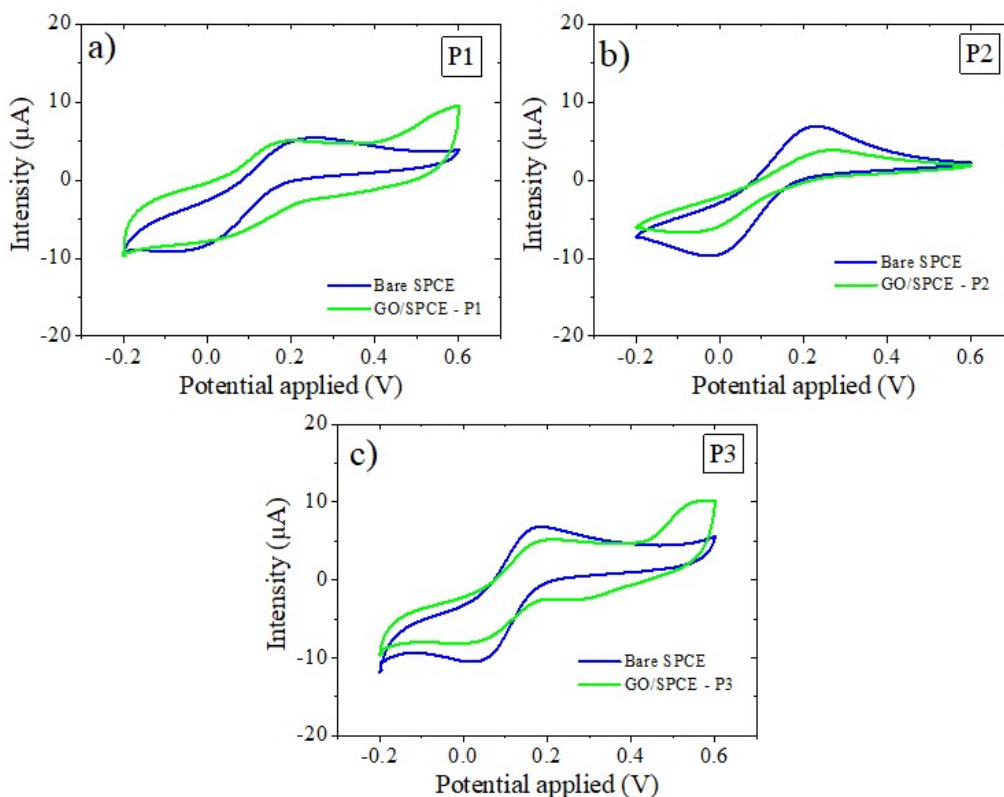


Figura 11. Grafice CV inregistrate in 1 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$, 0.1M KCl, pentru SPCE modificati cu formularea printabila pe baza de GO utilizand (a) modelul 1 , (b) modelul 2, respectiv (c) modelul 3.

Spectrele EIS (Figura 12) au fost inregistrate dupa fiecare CV pentru a confirma rezultatele voltametriei. Intr-adevar se observa o crestere substantiala a rezistentei la transfer de sarcina dupa modificarea cu formularea printabila pe baza de oxid de grafena a celor trei electrozi. Impedanta electrochimica arata faptul ca electrodul modificat cu formularea printabila pe baza de GO dupa modelul 2 (P2, 12 b) prezinta o conductivitate electrochimica mai mica fata de ceilalti doi SPCE, observandu-se in graficul Nyquist un semicerc crescut si bine conturat, reprezentativ pentru o rezistenta la transferul de sarcina de aproximativ 30 K Ω . Electrocul modificat cu GO – P1 (12 a) arata, de asemenea, o crestere a Rct, inasa semicercul nu este bine definit si indica o valoare de aproximativ 27 K Ω . Ultimul SPCE, cel modificat cu GO – P3 (12 c) prezinta un semicerc mai conturat, inasa Rct a crescut doar pana la aproximativ 17 K Ω . In concluzie, spectrele EIS confirma reultatele voltametriei ciclice si arata faptul ca modelul P2 de modificare a SPCE cu GO este cel mai eficient.

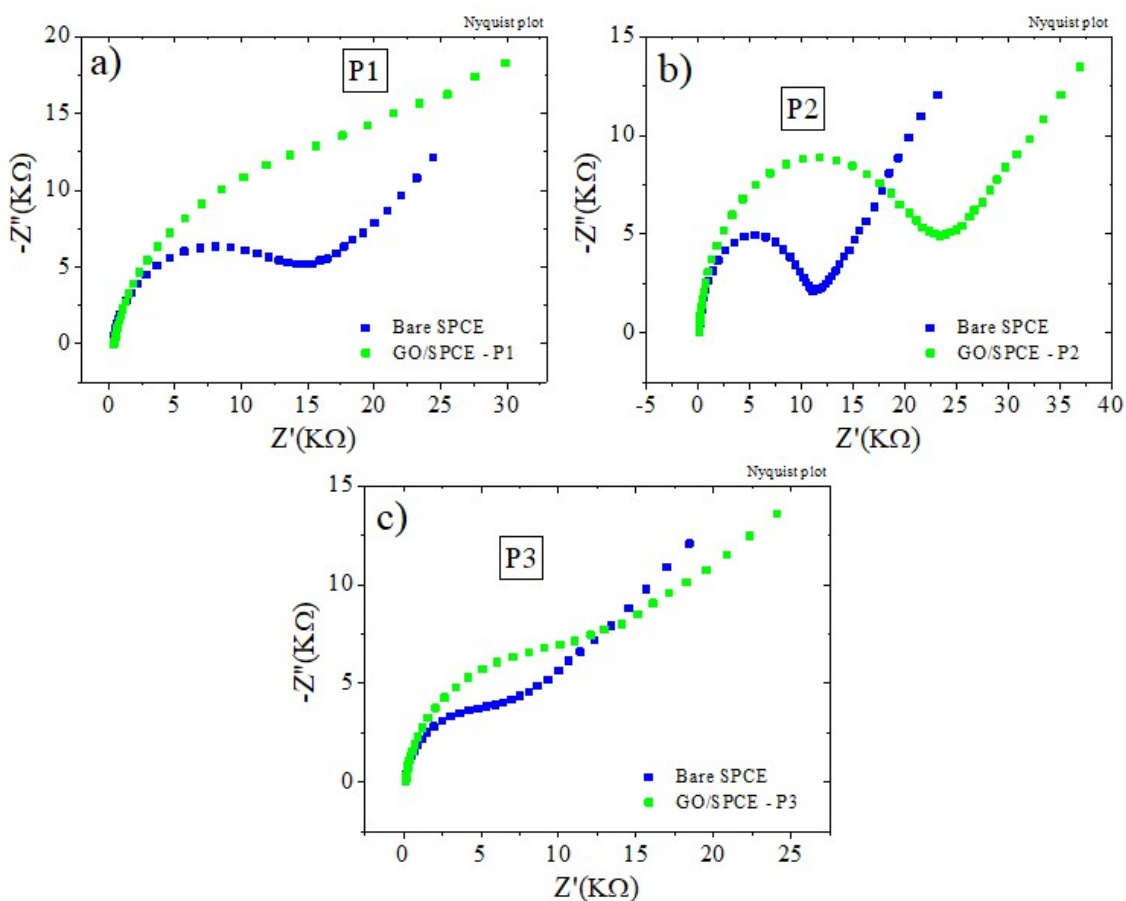


Figura 12. Spectre EIS inregistrate in 1 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, 0.1M KCl, pentru SPCE modificati cu formularea printabila pe baza de GO utilizand (a) modelul 1 , (b) modelul 2, respectiv (c) modelul 3.

In continuare a fost imobilizat bioreceptorul pe platformele electrochimice obtinute. In acest sens, electrozii au fost incubati cu 5 μM ADN sonda (5'-TTT CAA CAT CAG TCT GAT AAG CTA TCT CCC-3'), timp de patru ore, la temperatura camerei. Ulterior, SPCE modificati au fost incubati cu 0.5 μM ADN tinta, timp de doua ore la 45°C pentru a se realiza hibridizarea

intre cele doua secvente AND monocatenare si formarea AND-ului dublu catenar. Rezultate similare au fost obtinute pe cei trei electrozi in urma masuratorilor electrochimice.

In graficele CV (Figura 13) se observa in toate cele trei cazuri o modificare majora a curbei dupa imobilizarea bioreceptorului, intensitatea curentului crescand substantial. Mai mult decat atat, curbele CV au tendinta de a se muta spre dreapta iar ΔE_p a scazut semnificativ. Dupa hibridizarea sondei cu ADN tinta, intensitatea picurilor de curent scade pe toti cei trei SPCE, cea mai mare diferenta de semnal fiind inregistrata pe electrodul modificat cu GO dupa modelul 2 (Figura 13 b). De asemenea, se observa ca dupa incubarea in ADN sonda, SPCE modificat cu GO – P3 (Fig. 13 c) determina o intensitate a picurilor redox mai mare decat cea observata in cazul electrodului modificat cu GO – P1 (Fig. 13 a).

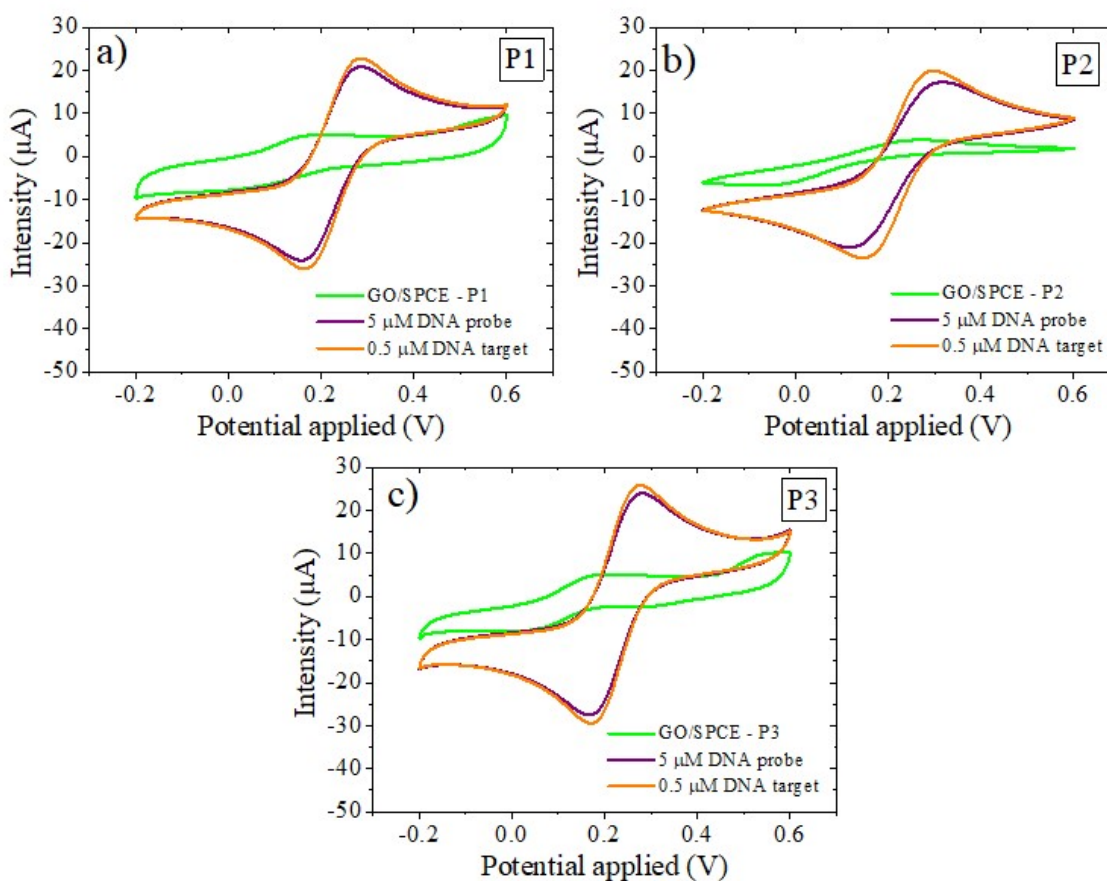


Figura 13 Grafice CV inregistrate in 1 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, 0.1M KCl, pentru SPCE modificati cu formularea printabila pe baza de GO utilizand (a) modelul 1 , (b) modelul 2, respectiv (c) modelul 3, pe care a fost imobilizata sonda ADN (5 μM) si a fost realizata hibridizarea cu 0.5 μM ADN tinta.

Din nou au fost efectuate masuratorile EIS (Figura 14) dupa analizele CV pe electrozii modificati cu GO si ADN. In toate cele trei cazuri se observa o diferenta semnificativa in semnal dupa imobilizarea bioreceptorului, iar semicercul in Nyquist plot nu mai este bine definit, cu

exceptia SPCE – GO-P2 (Figura 14 b), in cazul caruia s-a inregistrat o scadere notabila a rezistentei la transfer de sarcina dupa incubarea in ADN sonda. Electrozii modificati cu GO dupa modelul 1 (Figura 14 a), respectiv modelul 3 (Figura 14 c) prezinta spectre de impedanta mai largi si semnalul reprezentativ Rct nu se modifica dupa hibridizarea cu 500 nM ADN tinta.

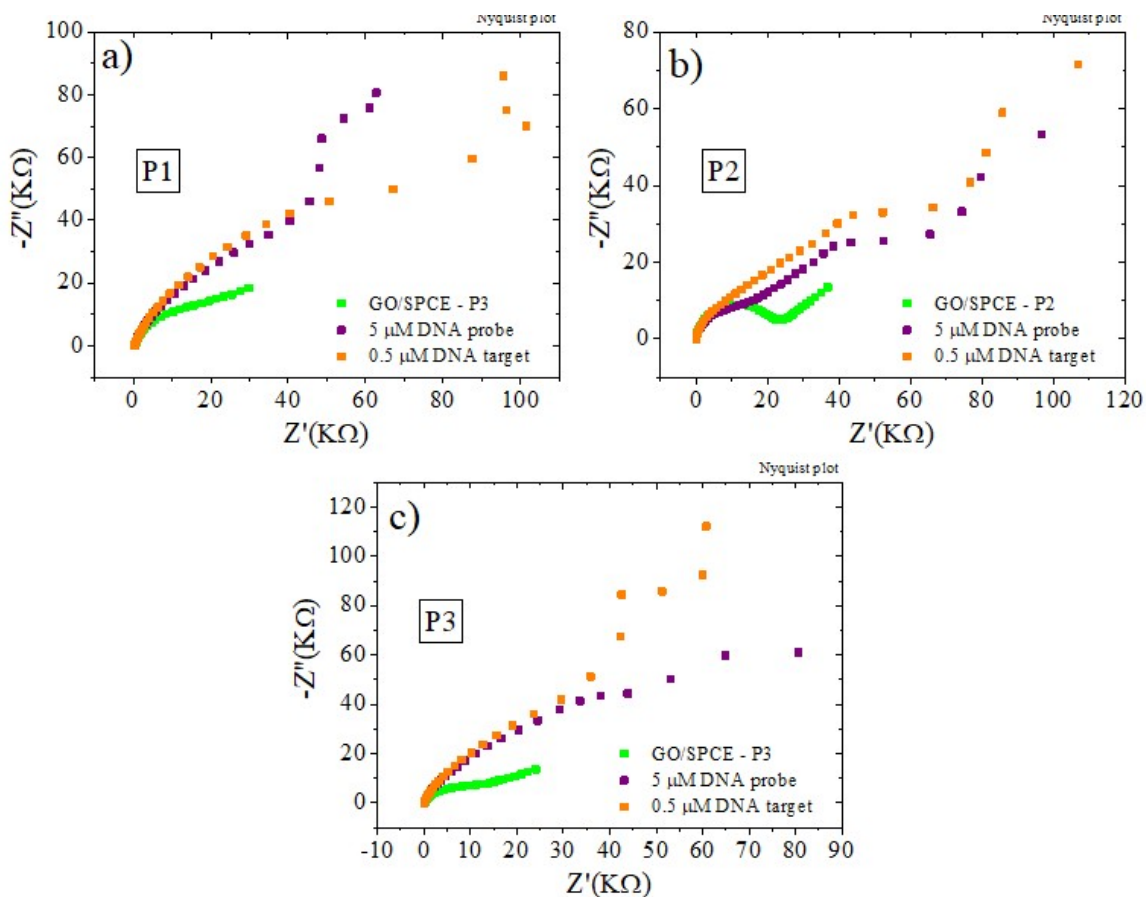


Figura 14 Spectre EIS inregistrate in 1 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, 0.1M KCl, pentru SPCE modificati cu formularea printabila pe baza de GO utilizand (a) modelul 1 , (b) modelul 2, respectiv (c) modelul 3, pe care a fost imobilizata sonda ADN (5 μM) si a fost realizata hibridizarea cu 0.5 μM ADN tinta.

Electrozii modificati cu formularea printabila pe baza de oxid de grafena au fost caracterizati din punct de vedere morfologic utilizand un microscop electronic de baleiaj cu fascicul focalizat de ioni (FIB-SEM) și instrumentul Versa 3D DualBeam (FEI Company, Hillsboro, OR, SUA), cuplat cu un sistem de analiza TEAM EDS (EDAX Inc., Pleasanton, CA, SUA). Semnalele electronilor secundari au fost detectate in modul de functionare la vid ridicat (6.1×10^{-4} Pa) la o distanta de 10 mm, o tensiune de accelerare de 10 kV si o dimensiune a spotului de 4.5, ceea ce a permis investigarea morfologiei suprafetei electrozilor in vedere plana (0° tilt). Stabilitatea imaginii a fost asigurată folosind software-ul SmartSCAN si optiunile de suprimare a derapajului DCFI ale instrumentului Versa 3D DualBeam.

Imaginile SEM obtinute la scala mare – 100 μM inregistrate pe electrozii modificati cu formularea printabila pe baza de GO dupa cele trei modele P1 (Fig. 15 A), P2 (Fig. 15 B) si P3 (Fig. 15 C) arata morfologia similara a acestora deoarece nu surprinde modelul diferit utilizat pentru modificarea fiecarui electrod in parte. Imaginile obtinute la o magnificatie mai mare si la scala de 5 μM pe SPCE modificati cu GO-P1 (Fig. 16 A), GO-P2 (Fig. 16 B) si GO-P3 (Fig. 16 C) releva morofologia caracteristica a oxidului de grafena, observandu-se acoperirea electrozilor cu straturi subtiri si incretite de GO, bine dispersate, nefiind observate aglomerari. Pe electrodul modificat cu GO-P3 (Fig. 16 C) se poate observa ca suprafata nu este uniform acoperita cu material grafenic, fiind surprins modelul de modificare al SPCE.

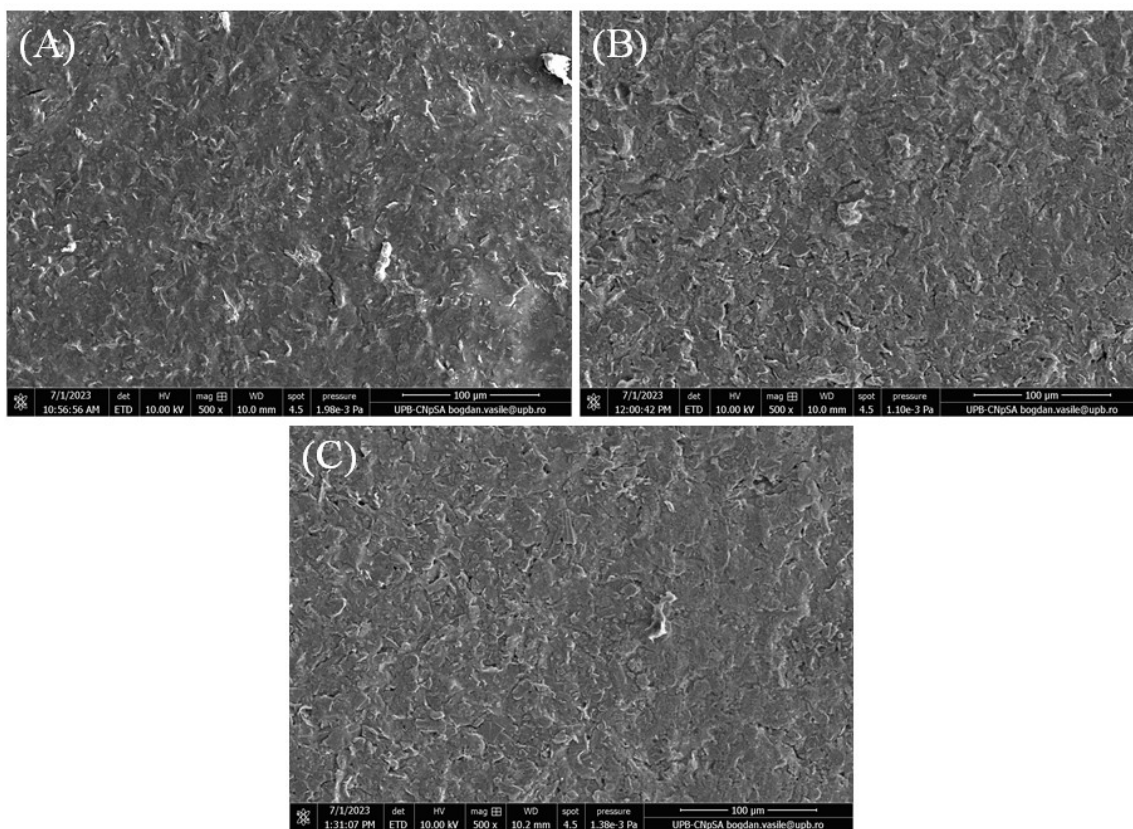


Figura 15 Imagini SEM inregistrate la o magnificatie $500 \times$ (scala de 100 μM), obtinute pe electrozii modificati cu (A) formularea printabila pe baza de GO-P1, (B) formularea printabila pe baza de GO-P2, (C) formularea printabila pe baza de GO-P3.

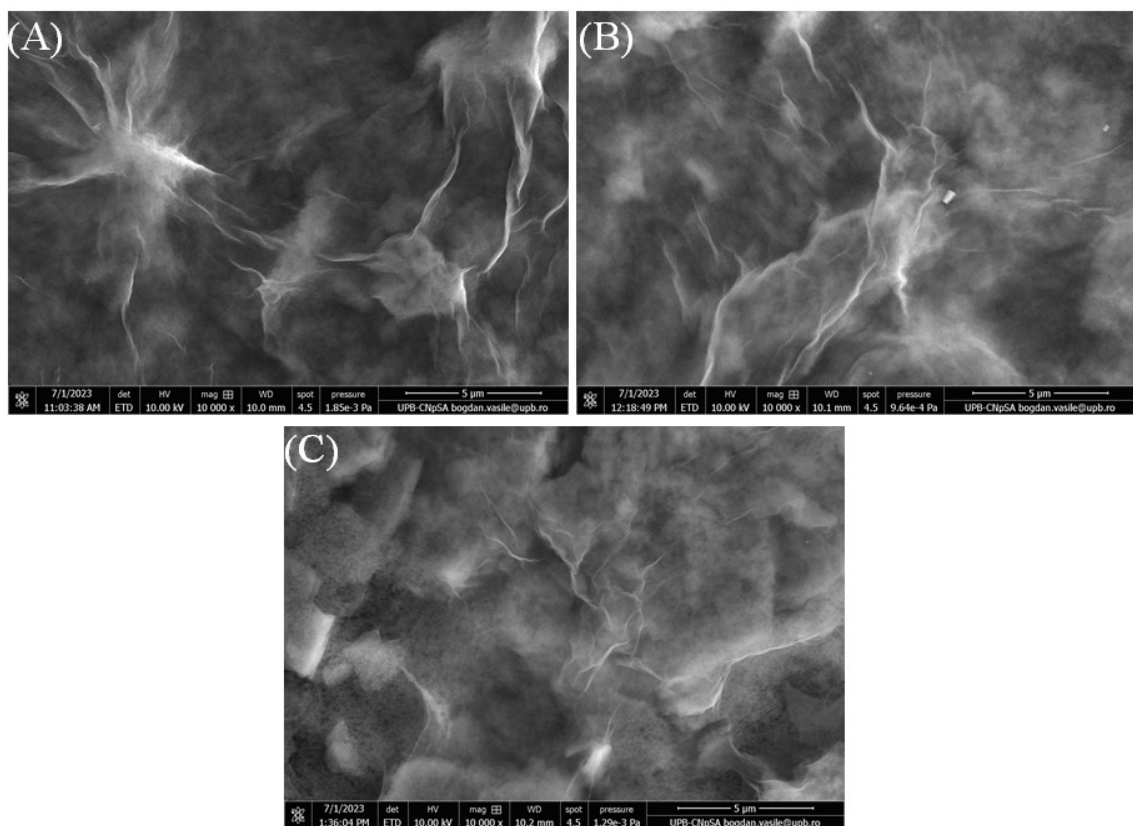


Figura 16. Imagini SEM inregistrate la o magnificatie $500 \times$ (scala de $5 \mu\text{M}$), obtinute pe electrozii modificati cu (A) formularea printabila pe baza de GO-P1, (B) formularea printabila pe baza de GO-P2, (C) formularea printabila pe baza de GO-P3.

Caracterizarea structurala a electrozilor modificati cu formularea printabila pe baza de GO utilizand cele trei modele diferite, P1, P2 si P3, s-a realizat cu ajutorul unui spectroscop Raman confocal Renishaw inVia Raman(Renishaw, Brno-Černovic, Republica Ceha), utilizand un laser cu o lungime de unda de 473 nm , obiectivul $100\times$ si o putere a laserului de 5% . Analiza de spectroscopie Raman (Fig. 17) arata o structura aproape identica in cele trei cazuri, datorita faptului ca dispersia formularea printabila pe baza de GO folosita pentru modificarea SPCE a fost aceeaasi, doar modelul fiind diferit. Banda vibratioanala D este positionata intre $1359\text{-}1361 \text{ cm}^{-1}$ pentru cele trei modele, iar banda vibrationala G se regaseste pe spectru intre $1598\text{-}1601 \text{ cm}^{-1}$, confirmand faptul ca dispersia GO a fost utilizata cu success in modificarea celor trei SPCE. Mai mult decat atat, raportul intensitatilor I_D/I_G este identic in cazul electrozilor modificati cu GO-P1 si GO-P2, avand o valoare de 1.23 , iar in cazul SPCE modificat cu GO-P3 valoarea raportului fiind de 1.17 .

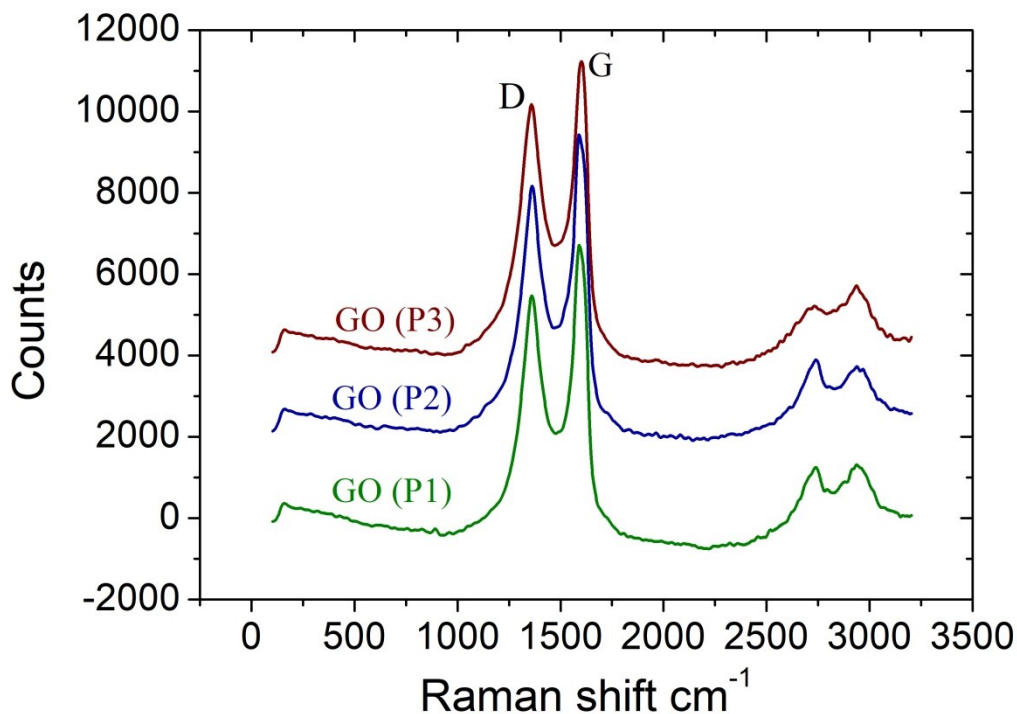


Figura 17 Spectrele de spectroscopie Raman obtinute pe electrozii modificati cu formularea printabila pe baza de GO utilizand cele 3 modele (P1, P2 si P3).

Imobilizarea bioreceptorului (secventa ADN) pe suprafata electrozilor modificati cu formularea printabila pe baza de GO a determinat modificari in structura, acestea fiind sugerate de modificarea raportului I_D/I_G . In Fig. 18 se observa spectrele de spectroscopie Raman pentru SPCE modificati cu formularea printabila pe baza de GO si ADN monocatenar. In cazul electrodului modificat cu GO-P1 (Fig. 18 A), benzile de intensitate D si G nu isi modifica pozitia, dar raportul intensitatilor benzilor scade la 0.89. In al doilea caz, al SPCE modificat cu GO-P2 (Fig. 18 B), banda vibrationala D isi schimba usor pozitia dupa imobilizarea bioreceptorului, mutandu-se de la 1362 cm^{-1} la 1353 cm^{-1} , iar banda G de la 1599 cm^{-1} la 1596 cm^{-1} . De asemenea, raportul I_D/I_G se modifica de la 1.23 la 0.97. In ultimul caz, functionalizarea cu ADN a electrodului modificat cu GO-P3 (Fig. 18 C) nu induce modificari substantiale ale pozitiei benzilor D, respectiv G, insa raportul intensitatilor I_D/I_G scade la 0.81 de la 1.17. Rezultatele obtinute in urma acestei analize sugereaza faptul ca imobilizarea bioreceptorului pe suprafata electrozilor modificati cu GO a fost realizata cu succes in toate cele trei cazuri, in care s-au folosit modele diferite de modificare a electrozilor.

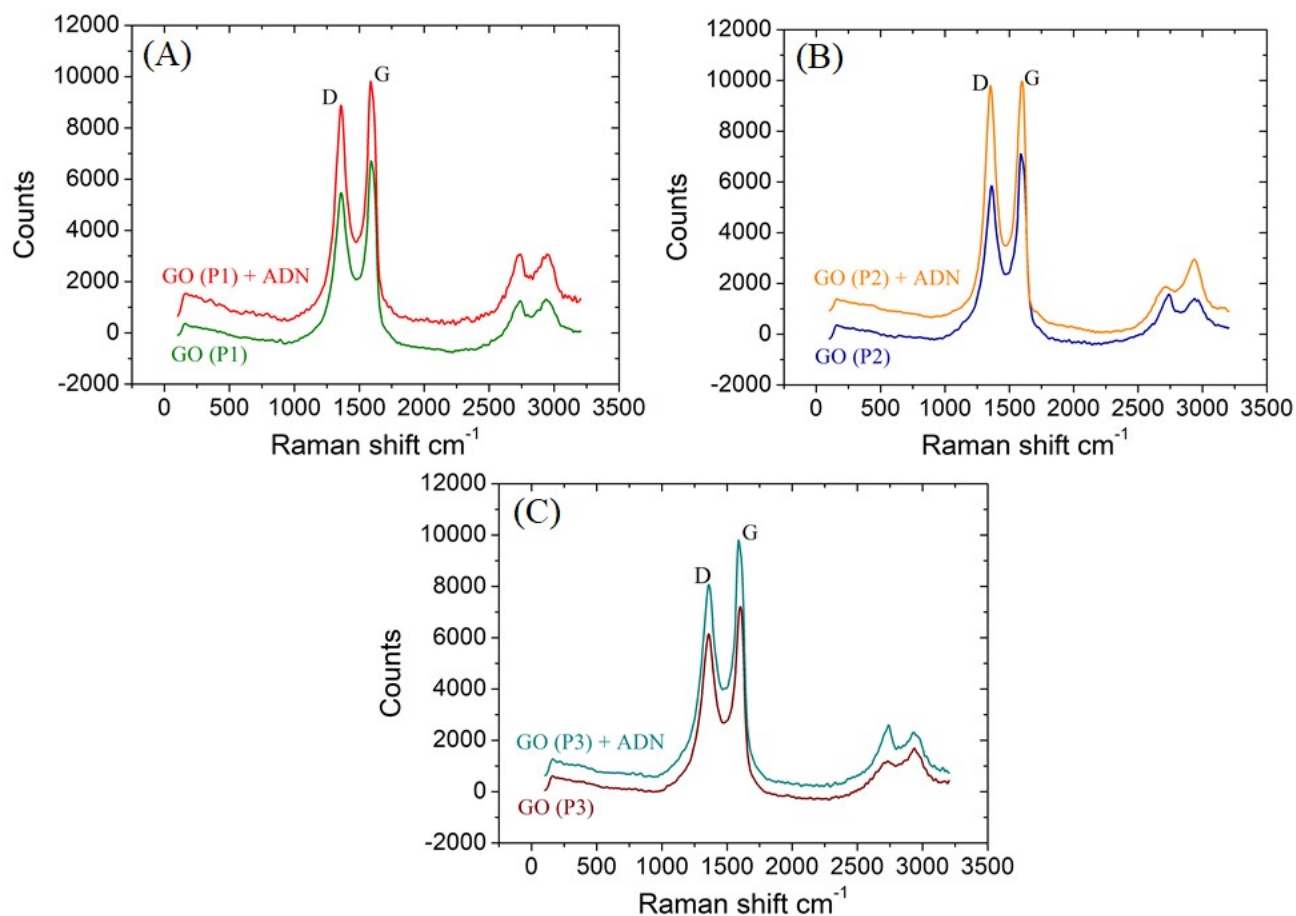


Figura 18 Imagini de spectroscopie Raman obtinute pe electrozii modificati cu (A) GO-P1 si ADN, (B) GO-P2 si ADN, (C) GO-P3 si ADN.

Sumar al progresului / Concluziile lucrării

Toate activitatile de cercetare prevazute in planul de realizare al proiectului pentru etapa curenta (Etapa II) de raportare, Activitatea 2 din Planul Realizarea subactivitatile A2.1-A2.10 au fost executate conform graficului de implementare.

In aceasta etapa am realizat sinteza si caracterizarea completa inclusiv in vitro si am demarat procesul de caracterizarea in vivo a formularilor printabile pe baza de gelatina metacrilata (GelMA), pectina metacrilat(PeMA) si formulari printabile nanocompozite pe baza de gelatina metacrilata (GelMA), pectina metacrilat(PeMA) si oxid de grafena (GO) si fibre de nanoceluloză oxidată (CNF). Folosind tehnologia de printare 3D au fost create scaffolduri asemănătoare matricei extracelulare a tesutului osos (4 formulari). Au fost realizate testarii din punct de vedere reologic a inkurilor și de asemeni s-a realizat modularea vâscozității si testarea pentru printare 3D dar si realizarea unor teste fizico-chimice si morfo-structurale. Formularile obtinute prezinta excelenta rezolutie de printabilitate, mai ales considerand dimensiunile mici si complexitatea detaliilor preproiectate. Din punct de vedere calitativ, structurile redau cu fidelitate modelul proiectat si prezinta integritate structurala se considera un obiectiv realizat asa cum reiese din lucrarea publicata 2.

Tot in aceasta etapa am avut in vedere fabricarea altor formulari printabile pe bază de alginat de sodiu și oxid de grafenă (GO) cu fidelitate de printare înaltă și acestea caracterizate reologic, mecanic (tracțiune, forfecare și compresiune), morfologic și structural. Rezultatele sunt subiectul unei Cereri de brevet A/00728/23.11.2023.

O alta activitate științifică a fost dedicată obținerii de nanoparticule de chitosan sau fibre electrofilate funcționalizate cu biomolecule capabile să declanșeze angiogeneza. Particulele de chitosan obținute în această etapă au dimensiune uniformă, nu prezintă aglomerări, formă sferică și diametru cuprins între 1÷3μm. În etapa următoare procesul de sinteză va fi optimizat pentru a obține particule de dimensiuni mai mici.

Tot în această etapă am continuat studiul formulării caragenan-gelatina și formulării nanocompozite pe baza de caragenan-gelatina și oxid de grafenă (GO) în vederea optimizării și atingerii exigențelor recenzenților (vezi lucrarea publicată -1).

De asemenea, ineurile conductoare fabricate în etapa anterioară au fost folosite în această etapă pentru modificarea electrozi serigrafiați pe baza de carbon prin intermediul printării 3D. O serie de SPCE au fost pretratați electrochimic și modificați cu GO utilizând 3 modele – P1, P2 și P3. Toți cei trei electrozi au fost caracterizați electrochimic, morfologic și structural.

Imaginile SEM arată o morfologie similară a oxidului de grafenă depus pe cei trei electrozi, cu straturi subțiri de grafenă, bine dispersate. Spectroscopia Raman arată structura tipică a GO [2], confirmând depunerea cu succes a materialului pe SPCE. De asemenea, modificarea raportului I_D/I_G indică modificarea structurii după imobilizarea ADN-ului monocatenar în toate cele trei cazuri.

Caracterizarea electrochimică s-a realizat utilizând metoda voltametriei ciclice și metoda spectroscopiei de impedanță. Pe toți cei trei electrozi a fost imobilizat bioreceptorul, după care a fost realizată hibridizarea sondei cu secvența ADN tinta complementară, ce a fost detectată electrochimic. Toate investigațiile indică faptul că modificarea SPCE cu modelul 2 (P2) conduce la obținerea unor rezultate mai bune comparativ cu celelalte două modele de modificare, facilitând imobilizarea unei cantități mai mari de oligonucleotide și, implicit, ajută la formarea evenimentului de hibridizare între sondele monocatenare, ce este ulterior detectat electrochimic. Pe baza rezultatelor obținute în cadrul proiectului au fost publicate 5 articole științifice și a fost elaborată o Cerere de brevet de asemnii au fost prezentate 8 lucrări științifice la evenimente științifice naționale și internaționale unele dintre acestea în calitate de lucrare invitată. Lista articolelor publicate:

[1] Alin Georgian Toader , George Mihail Vlasceanu, Andrada Serafim, Adela Banciu, and Mariana Ionita Double-Reinforced Fish Gelatin Composite Scaffolds for Osteochondral Substitutes, in jurnalul științific, Materials, 2023, 16(5), 1815; <https://doi.org/10.3390/ma16051815>, IF. 3.2, Q2.

[2] Alexandra I. Cernencu, George M. Vlasceanu, Andrada Serafim, Gratiela Pircalabioruc, Mariana Ionita, 3D double-reinforced graphene oxide –nanocellulose biomaterial inks for tissue engineered constructs, RSC Adv., 2023, 13, 24053, DOI: 10.1039/d3ra02786d, IF. 3.9, Q2

[3] Cernencu, Alexandra I. Ioniță, Mariana, The current state of the art in gellan-based printing inks in tissue engineering, Carbohydrate Polymers, 2023, Volum 309, 120676, 10.1016/j.carbpol.2023.120676, IF. 11.2, Q1

[4] Chiticaru Elena Alina, Damian Celina Maria, Pilan Luisa, Ioniță Mariana, Label-Free DNA Biosensor Based on Reduced Graphene Oxide and Gold Nanoparticles, Biosensors, 2023, Volum 13, 797, 10.3390/bios13080797, IF. 5.4, Q1.

[5] Georgian A. Toader, Florentin R. Nitu, Mariana Ionita, Graphene Oxide/Nitrocellulose Non-Covalent Hybrid as Solid Phase for Oligo-DNA Extraction from Complex Medium, Molecules, 2023, Volum 28, 4599, 10.3390/molecules28124599, IF. 4.6, Q1

[6] Ghițman Jana, Cojocaru Elena, Serafim Andrada, Ioniță Mariana. Procedeu de obținere a unor suporturi printate 3d pe bază de alginat de sodiu și oxid de grafenă; protocolul de sinteză a formulării printabile și procesul de printare” si nr de inregistrare A/00728/23.11.2023 –*Cerere de brevet*

Bibliografie

1. Chiticaru EA, Pilan L, Damian C-M, Vasile E, Burns JS, Ioniță M. Influence of Graphene Oxide Concentration when Fabricating an Electrochemical Biosensor for DNA Detection. Biosensors. 2019; 9(4):113. <https://doi.org/10.3390/bios9040113>
2. King, A., Davies, B., Noorbehesht, N. et al. A New Raman Metric for the Characterisation of Graphene oxide and its Derivatives. Sci Rep 6, 19491 (2016). <https://doi.org/10.1038/srep19491>

Livrabile realizate, indicatori de rezultat, diseminarea rezultatelor

ETAPA I/ 2022

	Articole stiintifice inaintate spre publicare	Diseminare rezultate prin participari la conferinte
Propus	1	0
Realizat	2	4

ETAPA II / 2023

	Articole stiintifice publicate	Diseminare rezultate prin participari la conferinte	Cerere de brevet
Propus	2	0	1
Realizat	5	4	1

Director de proiect,

06.12.2023

Dr. ing. Mariana Ionita

Kit pentru regenerare osoasă personalizată; o strategie pentru viitor Acronim REOSTEOKIT-PN-III-P4-PCE-2021-0244

PCE 103/2022

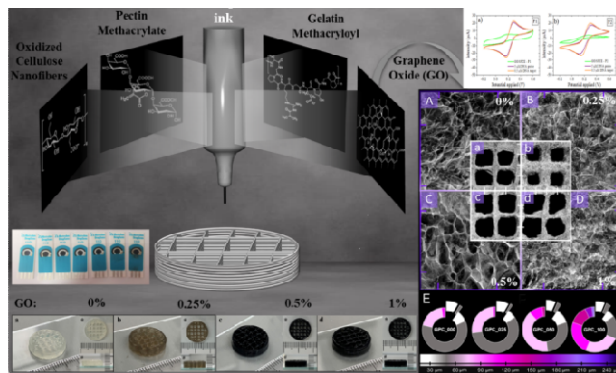
Rezumat executiv

Obiectivul general al proiectului REOSTEOKIT este de a îmbunătăți statusul de sănătate al societății, prin introducerea unor abordări unice pentru medicina regenerativa osoasa, care nu numai îmbunătățește terapiile substitutive celulare existente pentru afecțiunile grave precum fracturi osoase intarziata si neunionale, dar asigură tranziția holistică de la medicina regenerativă convențională către medicina integrativa personalizata.

In scopul indeplinirii obiectivului proiectului au fost create formulari simple si nanocompozite cu proprietăți emergente remarcabile, studiul nostru este primul care raportează formulări printabile pe baza de diferiti biopolimeri gelatin, gelan, caragenan, pectin si dublă armare cu oxid de grafena (GO) / fibre de nanoceluloză oxidată (CNF). De asemeni au fost abordate si inkurile conductoare pe baza de grafena / materiale grafenice pentru aplicatii precum biosenzori fabricati prin printarea 3D. In cadrul proiectului au fost optimizate biomaterialele compozite reticulate cu Genipin de gelatină de pește/kappa-caragenan (fG/κC) cu diferite concentrații de oxid de grafen (GO) pentru înlocuitori osteocondrali. Acestia au fost complet caractrizati prin micro-computer tomografie, studii de gonflare, degradări enzimatic, teste de compresiune, teste MTT, LDH și LIVE/DEAD iar rezultatele publicate in jurnalul stiintific Materials. Alte activitati de cercetare au vizat dezvoltarea de noi formulări printabile folosind o matrice polimerică gelatin metacrilata / pectin metacrilata (GelMa) / (PeMA) care integrează componente de ranforsare sinergică, oxid de grafena (GO) și CNF. Folosind tehnologia de printare 3D au fost create scaffolduri asemănătoare matricei extracelulare a tesutului osos.

Tot in aceasta etapa am avut in vedere fabricarea altor formulari printabile pe bază de alginat de sodiu și oxid de grafenă (GO) cu fidelitate de printare înaltă acestea sunt subiectul unei Cereri de brevet (A/00728/23.11.2023). Iar o alta activitate stiintifica a fost dedicata obtinerii de nanoparticule de chitosan sau fibre electrofilate funcționalizate cu biomoleculare capabile sa declanșeze angiogeneza. Performanța materialelor raportate este influențată semnificativ de parametri precum reologia, porozitatea, gonflarea, caracteristicile mecanice și biologice si permit fabricarea de rețele hibride printabile cu perspective pentru ingineria țesutului osos.

De asemeni au fost identificati parametri optimi pentru printarea cu formularile dezvoltate anterior pe baza de material grafenice (GMs), au fost modificati electrozii serigrafiați (SPCE) prin imprimare 3D și a urmat o etapa de caracterizare atat electrochimic cat si structural si morfologica iar electrozii cei mai promitatori au fost functionalizati cu biomarkerii specifici procesele de osteogeneza și testati prin cuantificarea evenimentului de legare aptamer-analit. Pe baza rezultatelor obtinute in cadrul proiectului au fost publicate 5 articole stiintifice si a fost elaborata o Cerere de brevet si au fost



prezentate 8 lucrari stiintifice la evenimente de prestigiu nationale si interantionale unele dintre acestea in calitate de lucrare invitata.