

**Proiect - PCE 103 din 07/06/2022**

(PN-III-P4-PCE-2021-0244)

**CONTRACTOR - UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE  
POLITEHNICA BUCUREȘTI**

**Kit pentru regenerare osoasă personalizată; o strategie pentru viitor**

**Toolbox for personalized bone regeneration; tailoring solutions for tomorrow**

## **Raport științific – PCE 103 - REOSTEOKIT**

### **Obiectivele prevăzute**

Obiectivul general al proiectului REOSTEOKIT este de a îmbunătăți statusul de sănătate al societății, prin introducerea unor abordări unice pentru medicina regenerativă osoasă, care îmbunătățesc terapiile substitutive existente pentru afecțiunile grave precum fracturi osoase întârziate și neunionale, dar asigură și tranziția holistică de la medicina regenerativă convențională către medicina integrativă personalizată. Obiectivul REOSTEOKIT este să ofere un kit de reconstrucție osoasă, care să îmbine terapia eficientă din punct de vedere al costurilor cu eficiența mult îmbunătățită față de soluțiile convenționale de tratament utilizate pentru restaurarea defectelor osoase și un dispozitiv fiabil de monitorizare în timp real al potențialului osteogenic al celulelor stem mezenchimale umane: o măsură cantitativă a formării de os. În termeni de indicatori, proiectul și-a propus generarea de publicații în jurnale de top (4 articole în jurnale Q1/Q2, prezentări la evenimente internaționale care vizează diseminarea și generarea de proprietate intelectuală (1 cerere de brevet).

### **Prezentarea rezultatelor obținute**

Realizarea obiectivelor a avut la bază activități științifice specifice pornind de la **dezvoltarea formulărilor printabile de bază (ink-uri / cerneluri); ink-uri conductoare pe bază de grafenă și ink-uri complexe pentru substituenți osoși**. Încă din **prima etapă** s-a realizat sinteza și caracterizarea de formulări printabile pe bază de gelatină metacrilată (GelMA), gellan metacrilat (GGMA) și formulări printabile nanocompozite pe bază de gelatină metacrilată, gellan metacrilat și oxid de grafenă (GO) (4 formulări). Un alt sistem studiat tot în Etapa I a fost formularea caragenan-gelatină și formulări nanocompozite pe bază de caragenan-gelatină și oxid de grafenă, iar principalele rezultate obținute sunt prezentate în Raportul aferent etapei 1 (5 formulări). Tot în Etapa I ne-am propus și realizat **testarea reologică a ink-urilor / cernelurilor fabricate și modularea vâscozității, urmată de testarea preliminară pentru printare 3D pentru controlul calității, dar ne-am propus și alte caracterizări avansate precum spectroscopie Raman (RS), microscopie electronică de transmisie (TEM) și baleiaj (SEM), micro- & nano- tomografie computerizată (CT), iar pentru ink-urile / cernelurile**

conductive au fost realizate studii de voltametrie ciclică (CV) și spectroscopie de impedanță electrochimică (EIS). În Etapa I ne-am propus să elaborăm 4 formulări printabile, am realizat 9, iar acestea au fost supuse testării din punct de vedere reologic și, de asemeni, s-a realizat modularea vâscozității ink-urilor și testarea preliminară pentru printare 3D (depunere prin injecție), dar și realizarea unor teste fizico-chimice și morfo-structurale. Formulările obținute prezintă excelentă rezoluție de printabilitate, mai ales considerând dimensiunile mici și complexitatea detaliilor preproiectate. Din punct de vedere calitativ, structurile redau cu fidelitate modelul proiectat și prezintă integritate structurală, astfel, se consideră un obiectiv realizat, așa cum se poate observa în Fig. 1. În vederea testării printabilității, au fost realizate diferite modele digitale 1D, 2D și 3D și arhitecturi CAD (geometrii specifice) pentru a servi drept modele pentru construcțiile printabile care au fost dezvoltate în cadrul proiectului (exp. Figura 1a) pentru substituenții osoși, dar și pentru electrozi.

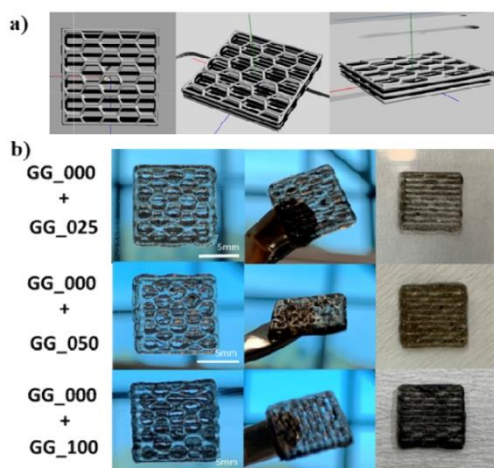


Figura 1. Modelul CAD (a) și fotografiile ale structurilor multimaterial printate 3D (b).

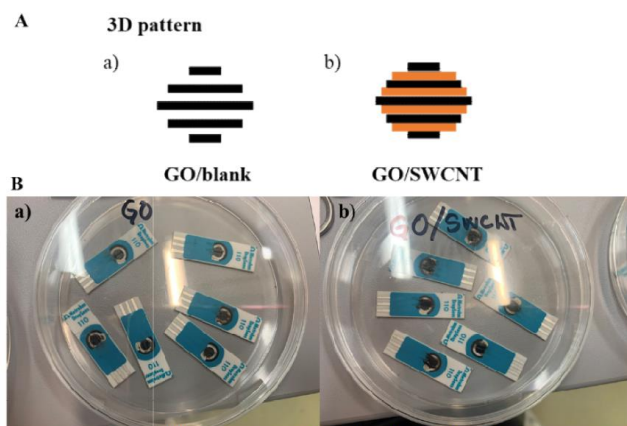


Figura 2. A. Pattern 3D de modificare a electrozilor serigrafiați pe bază de carbon cu GO (a) și GO/CNT (b) și B. fotografiile ale electrozilor pe care a fost efectuată depunerea de GO (a) și GO/CNT (b).

De asemeni, au fost fabricate ink-uri conductoare speciale pentru îmbunătățirea sensibilității substratului electrozilor și a conductibilității electrice în vederea obținerii biosenzorilor electrochimici pentru măsurarea biomarkerilor specifici dezvoltării țesutului osos. Electrozi serigrafiați pe bază de carbon (SPCE) au fost modificați cu oxid de grafenă și/sau nanotuburi de carbon (CNT) prin intermediul printării 3D (Fig. 2), iar rezultatele preliminare obținute (prin intermediul metodelor electrochimice CV și EIS) au fost promițătoare în termeni de îmbunătățire a conductivității electrice, dar și a stabilității și a reproductibilității rezultatelor. Toate aceste rezultate sunt prezentate in extenso în Raportul științific aferent Etapei I, dar și pe website-ul proiectului (<https://reosteokit.chimie.upb.ro/scientific-results.html>), precum și în publicațiile generate în prima etapă (2 lucrări științifice au fost înaintate spre publicare și 4 prezentate la diferite evenimente științifice de diferiți membri ai echipei – Lista completă a publicațiilor obținute în cadrul proiectului este prezentată la finalul acestui raport).

Considerând direcțiile de cercetare din prima etapă a proiectului, dar și obiectivul general, în **Etapa II** am vizat îmbunătățirea formulărilor printabile deja propuse, dar și dezvoltarea de noi 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 antiinflamatoare, porozitate mare cu pori interconectați). În acest sens, în Etapa II / 2023 am avut în vedere perfecționarea / modularea performanțelor seriei de ink-uri / formulări printabile simple și compozite pentru fabricarea de substituenți osoși sau biosenzori, avansate inițial pe bază de gelatina metacrilată, gellan metacrilat, sau caragenan, urmată de sinteza de ink-uri / cerneluri nanocompozite prin adăugarea de oxid de grafenă exfoliat corespunzător (diferite concentrații). În etapa II s-au efectuat studii pentru îmbunătățirea proprietăților de printare și obținerea substituenților osoși biomimetici (anizotropiei caracteristică țesutului osos).

Pentru formulările simple pe bază de caragenan-gelatină și formulările nanocompozite pe bază de caragenan-gelatină și oxid de grafenă s-au mai efectuat teste de **gonflare, degradare enzimatică, teste de compresiune și prin micro-CT, dar și studii *in vitro* indirecte pentru a evalua viabilitatea și proliferarea celulelor precursorare osteoblaste / hBM-MSK (LDH, MTT și teste live and dead)**. Analizele au arătat că formulările au morfologie omogenă, cu dimensiuni ideale ale porilor de 200-500 μm pentru aplicații osoase. Modulele de compresie, dar și studiile de viabilitate celulară pentru celulele MC3T3-E1 au indicat celule mai puțin viabile odată cu creșterea concentrației de GO. Rezultatele sunt publicate în lucrarea cu titlul „Double-Reinforced Fish Gelatin Composite Scaffolds for Osteochondral Substitutes”, în jurnalul științific *Materials*. Tot în Etapa II au fost studiate și formulări simple și compoziții noi în vederea obținerii unor formulări care îndeplinesc cerințele regenerării tisulare, dar și parametrii de printare. În acest sens, cercetarea 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 și fibre de nanoceluloză oxidată (CNF). Folosind tehnologia de printare 3D, au fost create 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 față de conținutul de polimer). Adăugarea de GO la hidrogel a îmbunătățit nu numai modulul de compresiune, ci și printabilitatea și fidelitatea scaffoldului comparativ cu sistemul coloid-gelatină/pectină pură. Formulările au fost analizate din toate punctele de vedere relevante pentru regenerarea osoasă (prevăzute în cadrul proiectului, reologic, structural, morfologic, gonflare și degradare, etc.) 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*, și prezentată pe scurt în Fig. 3 și Fig. 4.

Tot în Etapa II s-au fabricat formulări printabile pe bază de alginat de sodiu și oxid de grafenă 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. Am reușit să obținem suporturi printate 3D pe bază de alginat de sodiu și oxid de grafenă cu fidelitate a formei și reproductibilitate și geometrie controlată pentru aplicații personalizate în ingineria tisulară. Suporturile 3D pe bază de alginat de sodiu și oxid de grafenă au fost complet caracterizate atât structural, morfologic și mecanic, cât și din punct de vedere al abilității de printare și fidelitate a 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.

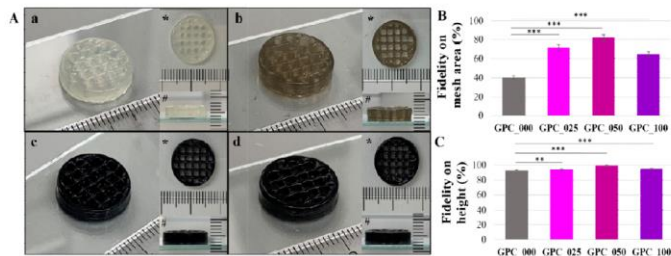


Figura 3. A. Imaginile formulărilor simple și nanocompozite, discuri cu diametrul de 15 mm, 10 straturi (\*) vedere de sus (#); B și C. Evaluarea cantitativă a printabilității.

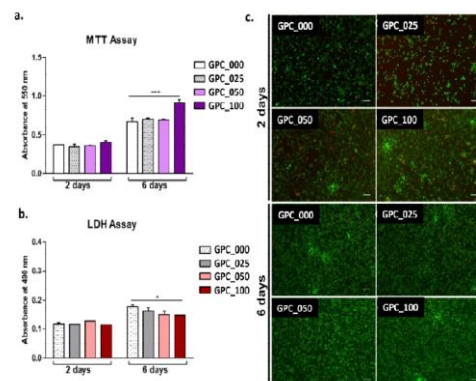


Figura 4. Evaluarea citotoxicității scaffoldurilor printate cu fibroblaste murine L929, (a) MTT, (b) LDH și (c) LIVE/DEAD, după 2 și 6 zile de cultivare .

Tot în Etapa II au fost demarate activități științifice în vederea **elaborării unui protocol pentru fabricarea fibrelor electrofilate și a unui protocol pentru sinteza particulelor polimerice pentru eliberarea unor agenți antiinflamatori**. Astfel, au fost obținute particulele de chitosan care, după dispersare, au prezentat morfologie sferică cu dimensiuni cuprinse între 1÷3  $\mu\text{m}$  și fără aglomerări (Fig. 5) și fibre electrofilate pe bază de chitosan și polietilenoxid (PEO). Procesul de electrofilare s-a realizat folosind un echipament de electrofilare cu climat controlat (IME Technologies) (Fig. 6). Pentru sinteza particulelor polimerice, chitosanul a fost modificat chimic prin reacție cu trimetoxi-silil-propil metacrilat (TSP), utilizând mecanismul de cuplare N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimidă - Nhidroxisuccinimidă (EDC-NHS), în vederea fabricării de particule cu domenii hidrofile și hidrofobe. Au fost sintetizate 4 materiale (CHT\_m1 - CHT\_m4) variind raportul molar TSP:D-glucozamină între 0.063:1 și 0.5:1. Acestea au fost dopate cu filochinonă - vitamina K (1.6% masic) și ulterior încapsulate în filme de chitosan nemodificat. Filochinona, cunoscută pentru efectele antiinflamatorii și de stimulare osteogenică, a fost eliberată din suporturile polimerice în tampon fosfat salin (PBS, 37°C, 8 h), iar concentrațiile au fost determinate prin spectrofotometrie UV la 244 nm, pe baza curbei de calibrare. S-a observat faptul că eliberarea a fost mai rapidă din substraturile cu un raport mai mare de modificare și că în decurs de 8 ore, mai mult de 90% din cantitatea de substanță bioactivă a fost eliberată în toate formulările. În plus, probele de nanofibre au fost suspendate în vapori de glutaraldehidă timp de 3 ore, apoi au fost imersate în apă distilată timp de 3 zile pentru a elimina glutaraldehida reziduală, iar în final membranele au fost mojarate și funcționalizate necovalent cu factor de creștere endotelial vascular (VEGF) și au fost folosite în etapa ulterioară pentru obținerea de noi suporturi 3D.

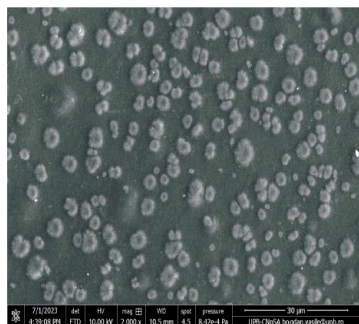


Figura 5. Morfologia particulelor de chitosan, magnificație 2000x.



Figura 6. Procesul de electrofilare și membrana pe bază de nanofibre polietilenoxid și chitosan.

O altă direcție de cercetare a Etapei II a avut ca obiectiv **optimizarea procesului de printare a biosenzorilor electrochimici funcționali pe SPCE**. În acest sens o serie de SPCE au fost pretratați electrochimic și modificați cu GO utilizând 3 modele – P1, P2 și P3 (Fig. 7).

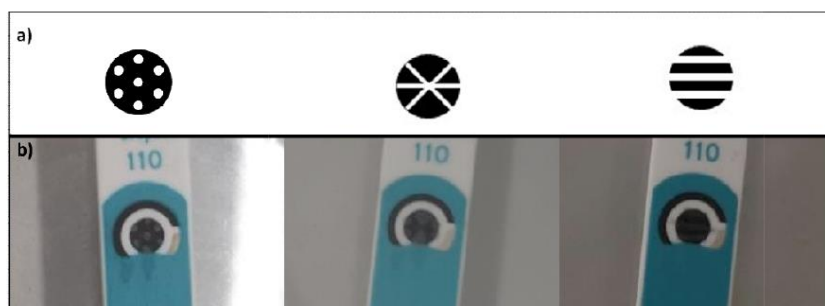


Figura 7. Pattern de modificare a electrozilor serigrafiați pe bază de carbon cu GO (a) și fotografiile ale suprafețelor pe care a fost efectuată depunerea de GO (b).

Toți cei trei electrozi au fost caracterizați electrochimic, morfologic și structural. Imaginile SEM au arătat o morfologie similară cu cea a oxidului de grafenă depus pe cei trei electrozi, cu straturi subțiri de grafenă, bine dispersate. O altă activitate științifică a fost detecția de **biomarkeri specifici proceselor de osteogeneză (ALP, RUNX2) prin cuantificarea evenimentului de legare aptamer-analit**. Oligonucleotide personalizate pentru a îndeplini cerințele experimentului au fost utilizate pentru dezvoltarea biosenzorului. Spectroscopia Raman arată structura tipică a GO și a confirmat depunerea cu succes a materialului pe SPCE, iar modificarea raportului  $I_D/I_G$  indică și 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 electrozii a fost imobilizat bioreceptorul, după care a fost realizată hibridizarea sondei cu secvența ADN țintă 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. Protocolul a fost îmbunătățit și a permis obținerea unui biosenzor electrochimic pentru detecția de ADN, stabil, reproductibil și specific, iar rezultatele sunt prezentate în detaliu în Raportul Științific aferent Etapei II și pe website-ul proiectului (<https://reosteokit.chimie.upb.ro/scientific-results.html>), și publicate în lucrarea științifică cu titlul „Label-Free DNA Biosensor Based on Reduced Graphene Oxide and Gold Nanoparticles”, Biosensors, 2023.

**Etapa III** a proiectului a avut ca obiectiv dezvoltarea formulărilor pentru printare 3D în vederea obținerii unor suporturi cât mai complexe pe baza rezultatelor obținute anterior, dar și dezvoltarea de formulări actinice pentru printare 4D. În acest sens, au fost formulate ink-uri complexe pe bază de alginat de sodiu (A), nanofibrile de celuloză (C), nanofibre electrofilate (N) (preparate în Etapa II) cu / fără GO (G) în diferite concentrații (0.1 – 0.5 % de masă). Ink-urile multicomponent astfel preparate au fost supuse procesului de printare 3D, utilizând bioimprimanta 3D BIOX6 de la Cellink. Suporturile printate 3D au fost gelificate ionic folosind o soluție de  $\text{CaCl}_2$  2%. Pentru investigații suplimentare, suporturile 3D au fost liofilizate.

S-a efectuat **testarea reologică a ink-urilor și modularea vâscozității, urmată de testarea pentru printare 3D, dar și toate tipurile de caracterizări prevăzute în cadrul proiectului.** Din Fig. 8A reiese că efortul de forfecare crește odată cu viteza de forfecare, în cazul tuturor formulărilor. Fig. 8B arată că toate compozițiile precursorare prezintă un comportament de subțiere prin forfecare. Cernelurile investigate prezintă un comportament asemănător gelului cu  $G'$  mai mare decât  $G''$  în regiunea vâscoelastică (LVR); cerneala ACNG-0.1 a arătat cel mai mare interval LVR.

Rezultatele testului căderii filamentului au arătat că cerneala AC a prezentat cele mai bune proprietăți de printare, conform valorii indicelui de printabilitate ( $Pr$ ) de  $1.03 \pm 0.04$  (Fig. 9). Însă, odată cu creșterea concentrației de GO,  $Pr$  scade, fapt ce sugerează capacități slabe de printare ale cernelurilor ACNG-0.2 ( $0.83 \pm 0.04$ ) și ACNG-0.5 ( $0.71 \pm 0.03$ ).

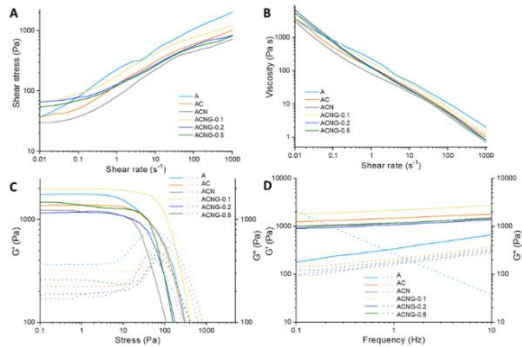


Figura 8 . Rezultate reologice: efort de forfecare (A) și vâscozitate (B) ca log-funcția log a vitezei de forfecare pentru cernelurile formulate; modulele elastic ( $G'$ ) și vâscos ( $G''$ ) versus (C) efort și (D) frecvență pentru cernelurile precursorare.

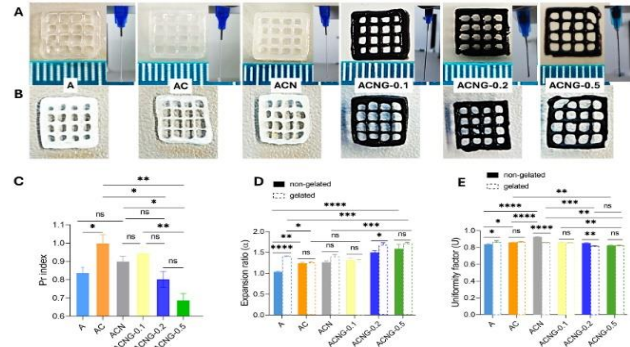


Figura 9. Evaluarea printabilității cernelurilor formulate. Imagini optice ale structurilor printate tip grid (A) înainte și (B) după gelifierea ionică; (C) Indicele de printabilitate al cernelurilor; (D) Raportul de expansiune al diametrului filamentului și (E) Factorul de uniformitate al cernelurilor cu și fără condiții de gelifiere.

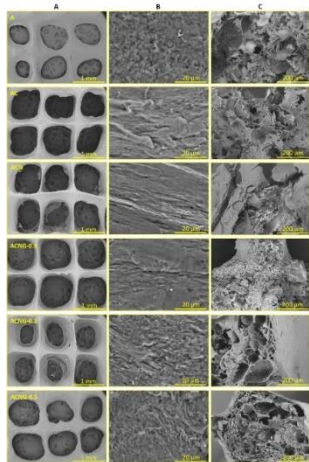


Figura 10 . Imagini SEM cu (A) vedere de sus, (B) suprafață și (C) în secțiune transversală obținute pentru suporturile liofilizate, la scară de 1 mm, 20  $\mu$ m și 200  $\mu$ m.

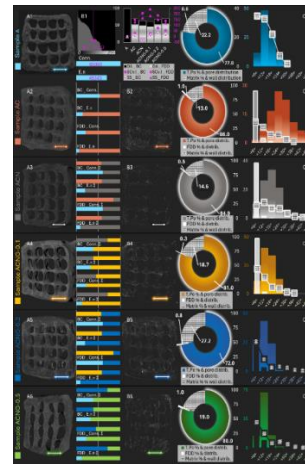


Figura 11. Analiza  $\mu$ -CT cantitativă și calitativă.

Imaginile SEM (Fig. 10A) au confirmat morfologia poroasă anizotropă a suporturilor printate 3D, acestea prezentând o suprafață ruгоasă și neregulată, care imită aspectul matricii extracelulare a osului natural. Microstructura internă 3D a suporturilor printate a fost analizată prin tehnica  $\mu$ -CT (Fig. 11), unde pe baza rezoluției de scanare, au fost calculate porozitatea totală (T.Po), distribuțiile grosimii pereților porilor și domeniul dens de fibre (FDD). T.Po a variat considerabil între 72% pentru proba ACNG-0.2 și 89% pentru proba AC; acest lucru sugerează că există interacțiuni particulare în fază solidă stabilite între componentele cernelurilor.

Analiza FTIR (Fig. 12) a scos în evidență interacțiunile necovalente care au apărut atât între grupările funcționale ale matricii polimerice compuse din alginat de calciu și C, cât și între funcționalitățile componentelor de umplură NFs și GO.

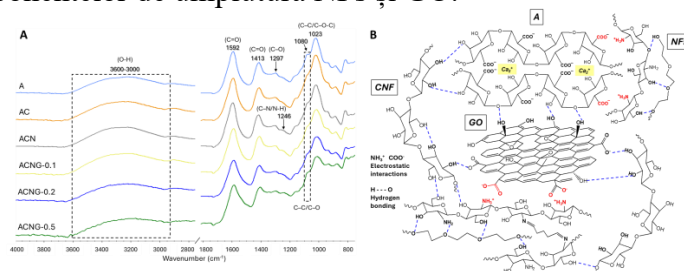


Figura 12. A. Spectrele ATR-FTIR ale materialelor analizate; B. Reprezentarea schematică a diferitelor tipuri de interacțiuni între grupările funcționale ale componentelor folosite în proiectarea suporturilor compozite.

De asemenea, s-au evaluat **proprietățile nanomecanice și au fost efectuate studii de gonflare și degradare *in vitro*** și s-au avut în vedere și studii *in vitro* indirecte pentru a evalua **viabilitatea și proliferarea celulelor precursoră osteoblaste în contact cu extractul de la arhitecturi 3D (LDH, MTT și teste live and dead) precum și morfologia celulară, aderența și expresia fenotipului markerilor specifici**. Testele MTT, LDH și Alizarin Red (Fig. 13) au confirmat biocompatibilitatea suporturilor în prezența osteoblastelor MG-63 și au subliniat că 0.1% GO a fost concentrația ideală pentru îmbunătățirea proliferării celulare, diferențierii și mineralizării matricii extracelulare; cel mai mare procent de aderență celulară a fost atins de proba ACNG-0.1.

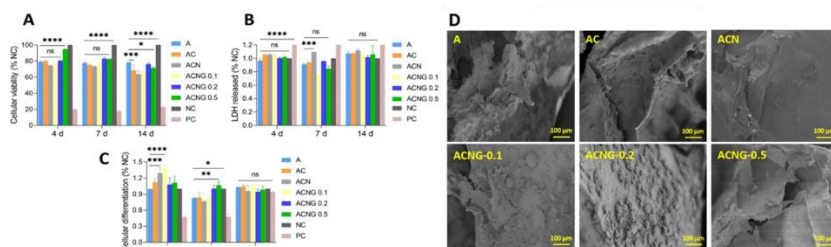


Figura 13. A. Rezultatele testelor MTT; B. LDH și C. Alizarin Red obținute pentru celulele MG-63 după 4, 7 și 14 zile de incubare cu materialele; D. Imagini SEM ale culturilor de osteoblaste expuse prin contact direct cu probele timp de 4 zile.

Rezultatele detaliate sunt publicate în lucrarea științifică „Dual nanofiber and graphene reinforcement of 3D printed biomimetic supports for bone tissue repair”, RSC Advances, 2024.

Un alt obiectiv al proiectului este demonstrarea *in vivo* a eficienței materialelor cele mai promițătoare obținute în cadrul proiectului. În acest sens, așa cum ne-am propus, experimentele pe animale au fost externalizate către **Universitatea de Vest Vasile Goldiș Arad, (Certificat**

**ANSVSA862/05.04.2016).** Substituenții osoși cei mai promițători obținuți au fost implantați în șoareci, subcutanat, pentru a demonstra proprietățile osteoinductive. Așa cum ne-am propus, s-au efectuat investigații histopatologice, imunohistochimice și imagistice prin tomografie computerizată. Răspunsul osteogenic, diferențierea și mineralizarea *in vivo* au fost investigate prin metode de colorare. Pentru pregătirea implantului nanocompozit am folosit 0.64 g de gelatină din pește (Sigma-Aldrich, Gelatină din piele de pește, BioReagent), ce au fost dizolvate în 1 ml de apă la 40°C, amestecând continuu până la dizolvarea completă. Separat, 0.16 g de gellan (Gumă gellan, Sigma-Aldrich) au fost adăugate la 2 ml din dispersia de specii grafenice (1 mg/ml). Amestecul a fost încălzit la 70°C și amestecat până la dizolvarea completă a gellanului. După dizolvarea completă a gellanului, 5 ml de suspensie de nanofibre de celuloză carboxilată (CNF) cu o concentrație de 1.2% au fost adăugați treptat la amestecul de gellan, la 70°C, amestecând continuu pentru omogenizare. În continuare, 3.2 mg de genipin (Genipin ≥98% (HPLC)) au fost adăugate în compoziția omogenă CNF-gellan-gelatină-specii grafenice. Amestecul a fost amestecat continuu la 40°C timp de 45 de minute pentru o distribuție uniformă a genipinului. Nanocompozitele obținute au fost turnate în plăci cu 96 de godeuri, acoperite și incubate la 37°C peste noapte pentru finalizarea procesului de reticulare. Ulterior, plăcile au fost imersate într-o soluție de CaCl<sub>2</sub> pentru reticularea gellanului. Ulterior, probele au fost congelate și liofilizate (-90°C, 0.01 mbar, timp de 72 de ore). Speciile carbonice considerate sunt oxid de grafenă redus funcționalizat cu grupări carboxil – rGO-CBX și amino – rGO-AMN, precum și un amestec al celor două specii CBX/AMN. Materialele sintetizate au fost exhaustiv caracterizate din toate punctele de vedere relevante pentru regenerarea osoasă, inclusiv teste *in vitro* și *in vivo*, rezultate prezentate în lucrarea „The role of functionalization charges in graphene nanocomposites for bone regeneration”, înaintată spre publicare la Scientific Reports, 2024. Pentru experimentul *in vivo* au fost utilizați șoareci CD1 în vârstă de 6-8 săptămâni, greutate: 20-30 g, din biobaza Universității de Vest Vasile Goldiș din Arad. Manipularea animalelor a fost efectuată în conformitate cu Directiva UE 2010/63 /UE, iar experimentul a fost aprobat de către Comisia de Etică a Cercetării Științifice din Universitate (Aviz nr. Nr. 27 din 31.05.2023) și autorizat de către Direcția Națională Sanitar Veterinară și de Siguranță a Alimentului (Autorizație ANSVSANr. 23 din 13.07.2023). Materialele au fost implantate într-un buzunar subcutanat pe spatele animalelor după gonflarea lor timp de o oră (Fig. 14). Cele 4 tipuri de materiale au fost următoarele: gellan-gelatină-CNF (GC), gellan-gelatină-CNF-GCarbox (GC-CBX), gellan-gelatină-CNF-GAmino (GC-AMN), gellan-gelatină-CNF-GAmino+GCarbox (GC-CBX/AMN), câte 10 animale/grup. S-a realizat și un grup de animale de control fără material implantat.

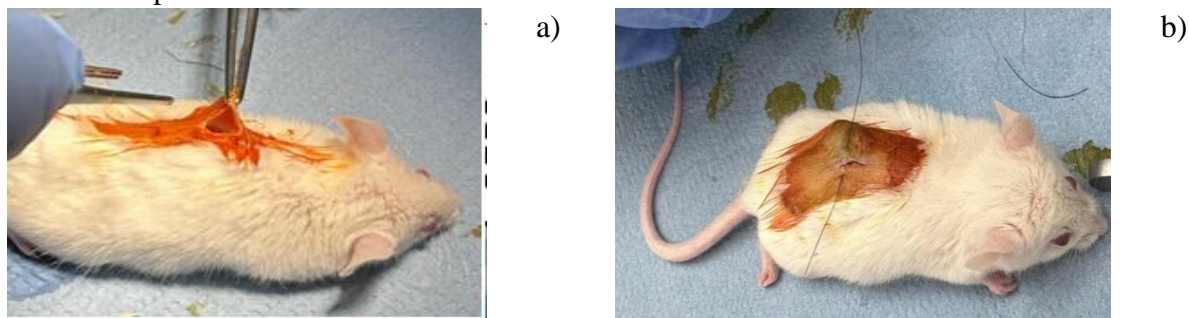


Figura 14. Design experimental: a) Realizarea buzunarului dorsal pentru implantare; b) Sutura tegumentului după implantare.



Protocolul pentru colorația hematoxină-eozină, Alizarin red S pentru evidențierea calciului în probele histologice, colorația tricromică Gomori și imunofluorescență sunt descrise în detaliu în lucrarea înaintată spre publicare cu titlul „The role of functionalization charges in reduced graphene oxide nanocomposites for bone regeneration”, Scientific Reports.

Rezultatele obținute prin metodele menționate mai sus au fost evaluate statistic utilizând metoda one-way ANOVA, urmată de testul de comparație multiplă Tukey. În acest sens, a fost utilizat software-ul GraphPadPrism 6.0 (San Diego, CA, SUA). Toate rezultatele sunt prezentate ca medie  $\pm$  SD din  $n = 3$  experimente, iar valorile  $p < 0.05$  au fost considerate semnificative din punct de vedere statistic. Șoarecii nu au prezentat complicații postoperatorii. În plus, niciun animal nu a murit după implantare și nu au fost detectate inflamații sau infecții în zonele rănite pe perioada celor 8 săptămâni de experiment.

Biocompatibilitatea *in vivo* a fost demonstrată prin colorația tricromică Gomori, ce a evidențiat formarea unei capsule fibroase de collagen în jurul materialelor la 8 săptămâni de la implantare subcutanată (Fig. 15A), în special pentru GC, ceea ce explică up-regularea semnificativă a Col-1 pentru acest grup comparativ cu martorul, în timp ce pentru GC-CBX, GC-AMN, GC-CBX/AMN, expresia este semnificativ mai mică comparativ cu materialul simplu (GC). Celulele gigante de corp străin (FBGC) nu au fost observate la săptămâna 8 în niciunul dintre grupuri.

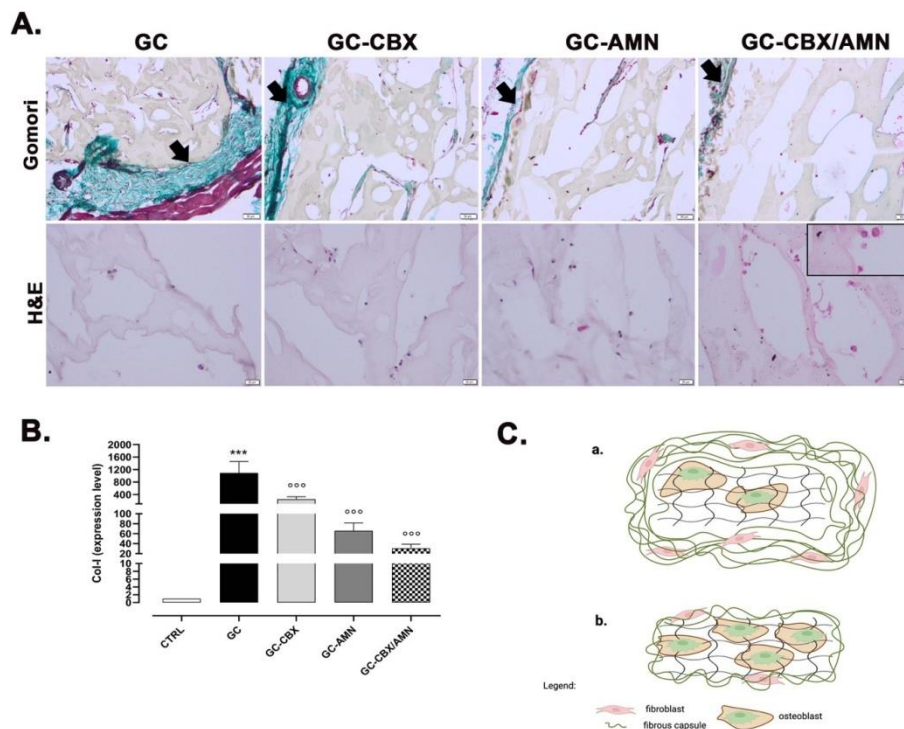


Figura 15. Analiza biocompatibilității *in vivo* a implanturilor subcutanate gellan-gelatină-CNF (GC), gellan-gelatină-CNF-GCarbox (GC-CBX), gellan-gelatină-CNF-GAmino (GC-AMN), gellan-gelatină-CNF-GAmino+GCarbox (GC-CBX/AMN) la 8 săptămâni post-implantare. A. Imagini histologice în col. Gomori evidențind (verde) grosimea variabilă a capsulelor (săgeată), care înconjoară diferitele materiale (scală 50  $\mu$ m) și aspectul histologic al materialelor infiltrate cu celule în colorație HE (scală 20  $\mu$ m). Detaliu - celule diferențiate care secretă matrice; B.

Expresia genică a Col-1 pentru loturile experimentale.\*\*\* P < 0.001 vs. CTRL, °°° P < 0.001 vs. GC; C.

Reprezentarea schematică a materialelor implantate, evidențind capsula fibroasă groasă cu fibroblaste active

producătoare de collagen pentru GC și puține osteoblaste diferențiate în scaffold (a), respectiv o capsulă redusă cu puține fibroblaste pentru GC-CBX/AMN și mai multe osteoblaste diferențiate în scaffold (b).

Pentru a analiza abilitatea materialelor de a promova diferențierea celulelor osteoprogenitoare în osteoblaste în zone ectopice, am analizat markerii de osteogeneză care se exprimă în osteoblaste – osteopontin (OPN) și osteocalcin (OCN) prin imunofluorescență (Fig. 16). Analiza de imunofluorescență în microscopie confocală a relevat faptul că toate materialele implantate exprimă OPN și mai puțin OCN, imunopozitivitatea cea mai mare fiind înregistrată pentru GC-CBX/AMN.

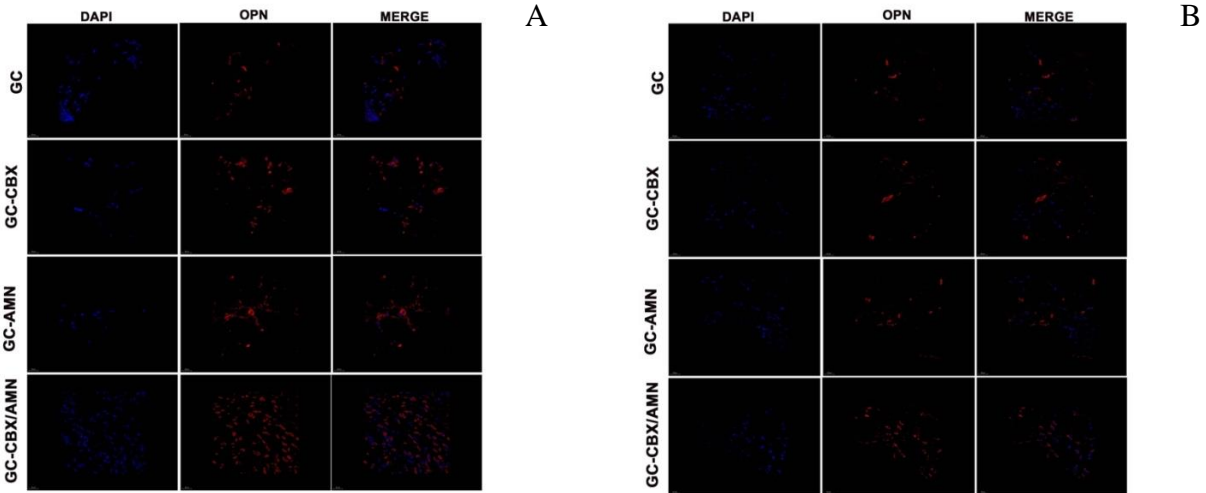


Figura 16. Imagini imunofluorescență ale OPN (A) și OCN (B) ale implanturilor subcutanate gellan-gelatină-CNF (GC), gellan-gelatină-CNF-GCarbox (GC-CBX), gellan-gelatină-CNF-GAmino (GC-AMN), gellan-gelatină-CNF-GAmino+GCarbox (GC-CBX/AMN) la 8 săptămâni post-implantare. IF-roșu; DAPI nuclei (albastru) Ob.63x.

Mineralizarea matricii produsă de osteoblaste a fost analizată utilizând colorația Alizarin red. Toate materiale au prezentat zone de mineralizare, mai pronunțate către marginea materialelor implantate. Cuantificarea acestora a relevat o creștere semnificativă a mineralizării la materialele GC-AMN și GC-CBX/AMN comparativ cu GC (Fig. 17).

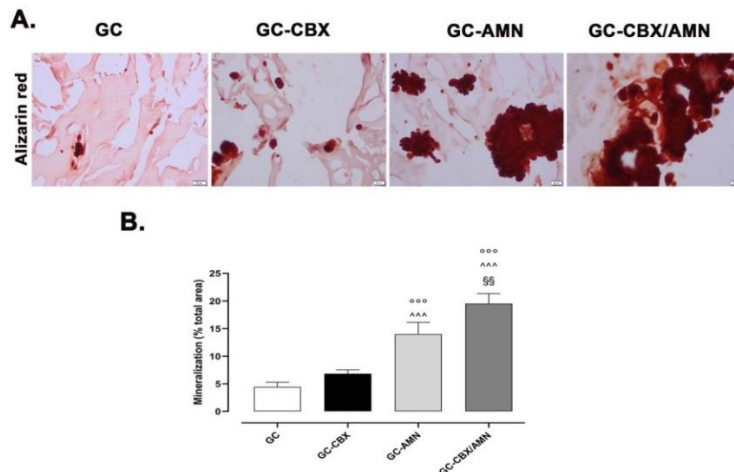


Figura 17. Analiza gradului de mineralizare ale implanturilor subcutanate gellan-gelatină-CNF (GC), gellan-gelatină-CNF-GCarbox (GC-CBX), gellan-gelatină-CNF-GAmino (GC-AMN), gellan-gelatină-CNF-

GAmino+GCarbox (GC-CBX/AMN) la 8 săptămâni post-implantare. A. Colorație Alizarin red (scală 20  $\mu\text{m}$ ); B. Cuantificarea gradului de mineralizare (% din aria totală analizată).<sup>ooo</sup> P < 0.001 vs. GC, <sup>^^^</sup> P < 0.001 vs. GC-CBX, <sup>§§</sup> P < 0.01 vs. GC-AMN.

Din analizele histopatologice și moleculare, materialul GC-CBX/AMN s-a dovedit a fi cel mai biocompatibil și cel care promovează cel mai bine diferențierea osteogenică a celulelor în zone ectopice (în afara sursei de celule osteoprogenitoare). Rezultatele au fost analizate și raportate în lucrarea cu titlul „The role of functionalization charges in graphene nanocomposites for bone regeneration”, înaintată spre publicare la jurnalul Scientific Reports.

Un alt obiectiv al Etapei III este detecția biomarkerilor osteogenici, ce joacă un rol esențial în monitorizarea mecanismelor osoase, precum formarea de os, dar și osteoporoza și osteoartrita. Fosfataza alcalină (ALP) și factorul de transcriere RUNX2 sunt doi biomarkeri importanți, relevanți pentru procesele de diferențiere celulară și mineralizare osoasă. Prin urmare, scopul acestei etape a fost dezvoltarea unei noi metode de detecție a acestor biomarkeri prin intermediul unui biosenzor electrochimic, urmărind activitățile 3.5 – 3.9 din cadrul proiectului și pe baza rezultatelor obținute anterior. În acest sens, am folosit protocolul dezvoltat în etapa anterioară, au fost utilizați electrozi serigrafiați, ce au fost modificați cu oxid redus de grafenă (RGO) în vederea îmbunătățirii proprietăților electrochimice. De asemenea, au fost realizate studii comparative între legarea covalentă și cea necovalentă a bioreceptorului pe suprafața electrozilor. În urma rezultatelor obținute, studiile au fost continuate prin imobilizarea sondei ADN prin adsorbție fizică și s-a realizat detecția moleculelor țintă (ALP și RUNX2) prin intermediul metodelor electrochimice CV și EIS. De asemenea, electrozii modificați au fost caracterizați pe larg din punct de vedere morfologic, structural și electrochimic. Studiul s-a concluzionat prin determinarea parametrilor electrochimici optimi pentru configurarea platformei într-un potențiosat miniaturizat și integrarea biosenzorului în dispozitivul portabil, ce se conectează la telefonul mobil, permițând detecția rapidă a analitului, în timp real, la locul de interes, pentru aplicații de tip „point-of-care” (POC).

Din punct de vedere al protocolului de lucru, s-au utilizat electrozi SPCE ce au fost mai întâi pretratați electrochimic în prezență de HCl și PBS, apoi modificați cu GO, ulterior redus electrochimic prin tehnica CV, în prezență de KCl, aplicând un potențial negativ. În continuare, bioreceptorul sub formă de ADN monocatenar sondă a fost imobilizat pe suprafață, fie prin legare covalentă, fie prin adsorbție fizică. Așa cum ne-am propus pentru **biomarkerii specifici proceselor de osteogeneză (de exemplu, ALP, COL1A2, RUNX2)**, au fost **testați prin cuantificarea evenimentului de legare aptamer-analit** și s-au folosit **oligonucleotide personalizate pentru a îndeplini cerințele experimentului, de exemplu, 5'-GACGGTTATGGTCAAGGTGAA-3' (aptamer) și 3'-CTGCCAATACCAGTTCCACTT-5' (analit) pentru RUNX2 și 5'-CGTCACTCTCATACTCCACATC-3' (aptamer) și 3'-GCAGTGATGGA-GTATGATGGA-5 (analit) pentru ALP**. În cazul legării covalente, RGO/SPCE au fost mai întâi incubați în soluție 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimidă și N-hidroxisuccinimidă (EDC-NHS). Odată ce sonda (una dintre cele de mai sus) a fost imobilizată, electrozii au fost incubați în soluție de surfactant Tween 20 pentru a bloca suprafața electrodului și a evita legarea nespecifică. În cazul legării necovalente, bioreceptorul a fost imobilizat prin adsorbție fizică imediat după obținerea RGO/SPCE. În final, SPCE funcționalizați au fost incubați în soluție ADN țintă, reprezentând molecula de interes, anume biomarkerii osteogenici ALP, respectiv RUNX2.

Electrozii modificați au fost caracterizați după fiecare etapă din punct de vedere morfologic, structural și electrochimic. Caracterizarea structurală a fost realizată prin SEM, cea

structurala prin spectroscopie Raman și spectroscopie fotoelectronică de raze X (XPS), iar cea electrochimică prin tehnicile CV și EIS. În plus, au fost realizate și studii de umectabilitate a suprafeței electrozilor modificați pentru a determina hidrofobicitatea acestora prin măsurarea unghiului de contact.

Modificarea electrozilor a fost investigată atât morfologic, cât și structural. În Fig. 18 (A-D) sunt prezentate imaginile SEM ce arată suprafața caracteristică a electrozilor de carbon (A), precum și acoperirea uniformă a acestuia cu un strat subțire de GO (B). Reducerea GO nu a contribuit la modificarea morfologiei (C), însă incubarea în ADN corespunzător ALP a condus la o schimbare a topografiei, indicând succesul imobilizării bioreceptorului pe suprafața RGO/SPCE.

Din punct de vedere structural, spectroscopia Raman (Fig. 18E) arată o creștere a raportului intensităților benzilor vibraționale D și G, ceea ce indică o creștere a defectelor în structura grafenică, fenomen ce se întâmplă după eliminarea grupărilor funcționale de pe suprafața GO, astfel confirmând obținerea cu succes a RGO. În plus, analiza XPS (Fig. 19) a oferit detalii suplimentare despre compoziția suprafeței și evoluția acesteia după fiecare etapă de modificare. Astfel, spectrele XPS C1 confirmă modificarea cu succes a SPCE cu GO (A) și reducerea electrochimică a acestuia (B), precum și imobilizarea sondei ADN (C) și a moleculei țintă (D) prin creșterea nivelului de azot în compoziție. Funcționalizarea SPCE cu ADN sondă și hibridizarea cu ADN țintă a fost confirmată și de spectrele XPS N1 (E, F), ce indică modificări ale valorilor energiei de legătură pentru carbon și azot.

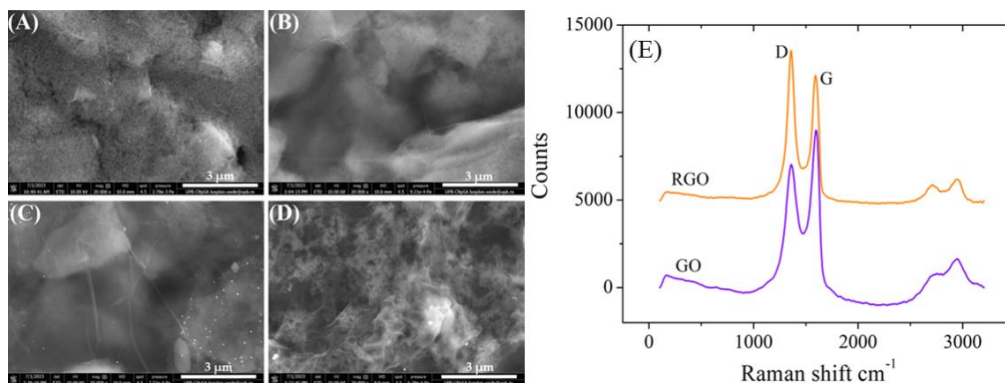


Figura 18. Caracterizarea morfologică (A-D) și structurală (E) a SPCE modificați. Imagini SEM înregistrate la scala 3 μm pe SPCE nemodificat (A), GO/SPCE (B), RGO/SPCE (C) ADN/RGO/SPCE (D). Spectroscopie Raman realizată pe GO/SPCE și RGO/SPCE (E).

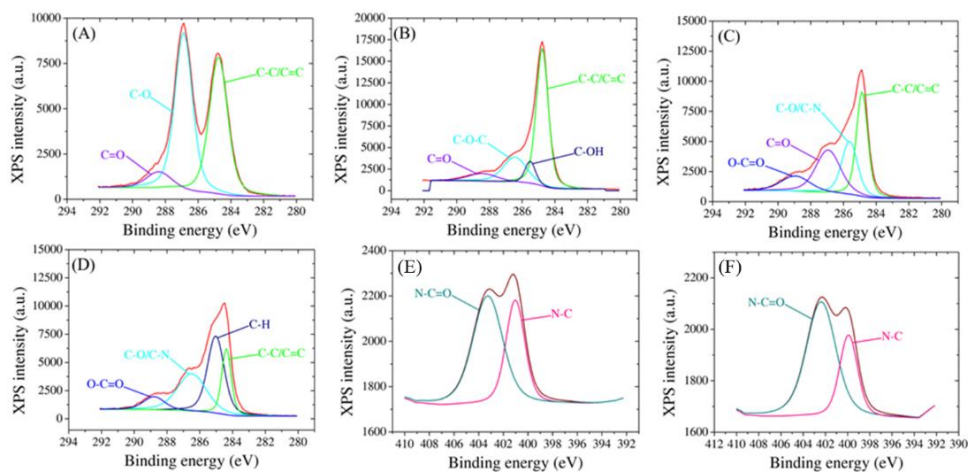


Figura 19. Spectre XPS de înaltă rezoluție: deconvoluția picului C1 pentru SPCE modificat cu GO (A), RGO (B), ADN sondă (C) și ADN țintă (D) și deconvoluția picului N1 pentru SPCE modificat cu ADN sondă (E) și ADN țintă (F).

De asemenea, umectabilitatea suprafeței electrozilor a fost investigată după fiecare modificare prin măsurarea unghiului de contact, în vederea evaluării interacțiunilor moleculare la suprafață, un aspect extrem de important în detecția biomarkerilor (Fig. 20). Inițial, electrodul nemodificat a prezentat un unghi de contact cu apa de  $90.7^\circ$ , confirmând caracterul hidrofob al carbonului amorf. Modificarea cu GO a crescut hidrofobicitatea suprafeței, fiind măsurat un unghi de  $50.9^\circ$ , ce a crescut ulterior la  $73.8^\circ$ , confirmând eliminarea grupărilor funcționale oxigenate în urma reducerii electrochimice. În plus, imobilizarea ADN sondă pe suprafața SPCE a determinat scăderea unghiului de contact la  $55.6^\circ$ , iar hibridizarea cu ADN complementar a crescut hidrofobicitatea ( $41.2^\circ$ ), indicând faptul că moleculele țintă rămân atașate pe suprafață, ceea ce este esențial pentru stabilitatea și reproductibilitatea biosenzorului.

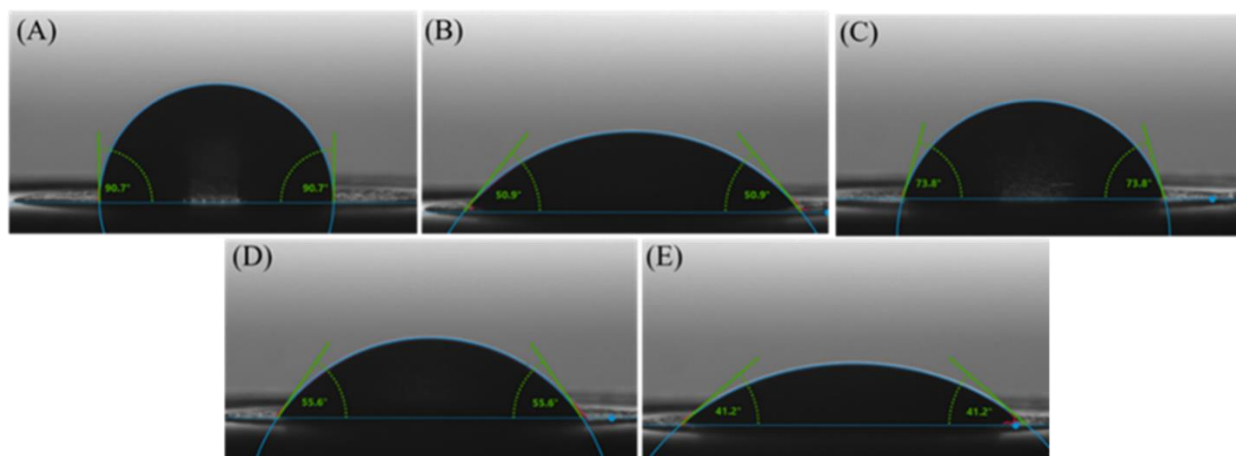


Figura 20. Unghiul de contact măsurat pe SPCE nemodificat (A) și SPCE modificat cu GO (B), RGO (C), ADN sondă (E) și ADN țintă (F).

Studiile pentru **legarea covalentă a bioreceptorului** (3.5) au fost efectuate prin determinarea proprietăților electrochimice în urma fiecărei etape de modificare (Fig. 21). Atât tehnica CV (A), cât și cea EIS (B), indică proprietățile caracteristice acestor modificări, anume o scădere drastică a conductivității electrice în urma depunerii GO pe suprafață, recuperarea

conductivității după reducerea electrochimică și o ușoară creștere după activarea grupărilor funcționale în EDC-NHS. Imobilizarea sondei ADN și detecția moleculei țintă au fost investigate tot prin CV (C) și EIS (D), ce confirmă succesul legării covalente a sondei prin scăderea curentului și creșterea rezistenței la transferul de sarcină (Rct). Incubarea în soluție ADN țintă a determinat o ușoară creștere a intensității curentului, însă modificarea Rct nu este semnificativă în EIS.

În continuare, au fost **efectuate studii comparative între legarea covalentă și necovalentă a bioreceptorului** (3.6), precum și studii pentru **detecția analitului** (3.7). În acest sens, SPCE au fost modificate cu RGO, iar ADN a fost imobilizat pe suprafață prin adsorbție fizică, cu scopul de a detecta moleculele țintă ALP și RUNX2 (Fig. 22). În cazul celor două seturi de electrozi, proprietățile electrochimice determinate prin CV (A, E) și EIS (B, F) sunt caracteristice modificării electrozilor cu GO, înregistrând o conductivitate electrică scăzută. Reducerea electrochimică a GO/SPCE a determinat o creștere semnificativă a intensității curentului, corelată cu o scădere drastică a Rct. În plus, imobilizarea bioreceptorilor ALP, respectiv RUNX2, prin adsorbția fizică a ADN monocatenar corespunzător fiecărui biomarker, a determinat scăderea conductivității electrice, înregistrată de ambele tehnici electrochimice. Detecția moleculelor țintă s-a realizat prin analiza modificărilor proprietăților după incubarea în diferite concentrații de ADN țintă corespunzător ALP (C, D) și, respectiv, RUNX2 (G, H). În cazul detecției ALP, se observă o ușoară scădere a curentului în CV (C), însă modificările măsurate prin EIS (D) sunt mai semnificative, înregistrând o creștere treptată a Rct. Detecția biomarkerului RUNX2 a fost realizată atât prin CV (G), ce a înregistrat o scădere a intensității curentului odată cu creșterea concentrației, cât și prin EIS (H), ce confirmă răspunsul prin scăderea semnificativă și repetată a Rct.

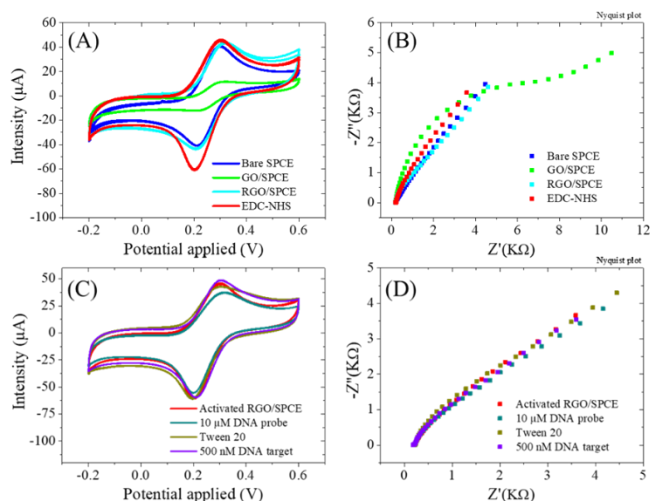


Figura 21. Studii electrochimice pentru legarea bioreceptorului prin legare covalentă și detecția analitului. Caracterizarea prin tehnicile CV (A) și EIS (B) a SPCE după modificarea cu GO, RGO și activarea în EDC-NHS; Determinarea proprietăților electrochimice prin CV (C) și EIS (D) după legarea covalentă a 10 μM ADN sondă, după incubarea în surfactantul Tween 20 și detecția a 500 nM ADN țintă.

Rezultatele sunt prezentate detaliat în 2 lucrări științifice publicate în cadrul acestei etape și care adresează mulțumiri proiectului: 1. „Towards Point-of-Care Medical Applications Using Electrochemical Biosensors”, University POLITEHNICA of Bucharest Scientific Bulletin, Series B-Chemistry and Materials Science, 86 (1), 2024; 2. „A Novel Approach Using Reduced

Graphene Oxide for the Detection of ALP and RUNX2 Osteogenic Biomarkers”, *Current Issues in Molecular Biology*, 46, 4489-4505, ce au fost prezentate la mai multe evenimente științifice și sunt parte din Teza de Doctorat a Elenei Alina Chiticaru (cercetător doctorand).

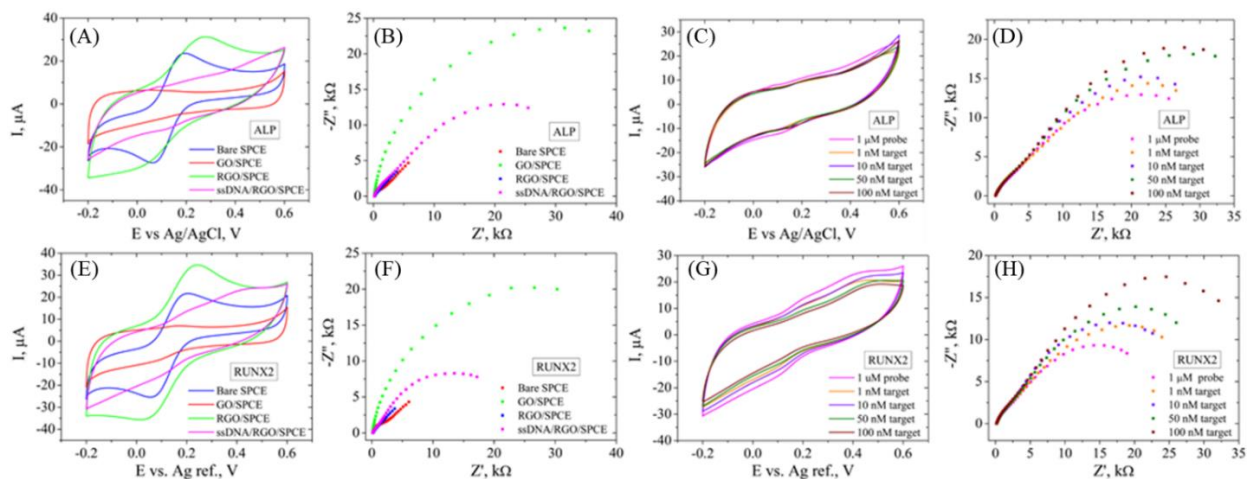


Figura 22. Caracterizarea electrochimică a SPCE modificate și detecția biomarkerilor osteogenici. Caracterizarea SPCE modificate cu GO, RGO și ADN sondă specific ALP prin CV (A) și EIS (B), și detecția electrochimică prin CV (C) și EIS (D) a diferite concentrații (1-100 nM) de ADN țintă corespunzător ALP. Caracterizarea SPCE modificate cu GO, RGO și ADN sondă specific RUNX2 prin CV (E) și EIS (F), și detecția electrochimică prin CV (G) și EIS (H) a diferite concentrații (1-100 nM) de ADN țintă corespunzător RUNX2.

O altă activitate este cea de **integrare a biosenzorului într-un dispozitiv portabil și evaluarea performanței acestuia**. În cadrul acestei activități (3.8) au fost determinați parametrii electrochimici optimi pentru configurarea în potențiosstatul miniaturizat (Tabel 1) cu scopul de a integra biosenzorul în dispozitivul portabil (Activitatea 3.9). Astfel, potențiosstatul/analizatorul de impedanță Sensit Smart a fost conectat la telefonul mobil, pe care a fost instalat softul (aplicația) PStouch (v2.8).

Parametrii optimi pentru pregătirea SPCE prin tehnica CV în prezență de HCl (Fig. 23 A) includ interval de curent: 2  $\mu$ A – 1 mA; t echilibru: 0 s; E început: +0.5 V; E vârf 1: +0.5 V; E vârf 2: -1.5 V; E pas: 0.01 V; viteză de baleiaj: 0.05 V/s; număr cicluri: 5. Al doilea pas în pregătirea electrozilor pentru modificări ulterioare a constat în tratament CV în prezență de PBS (Fig. 6 B), iar parametrii optimi au fost determinați ca fiind: interval de curent: 2  $\mu$ A – 1 mA; t echilibru: 0 s; E început: 0 V; E vârf 1: +2 V; E vârf 2: 0 V; E pas: 0.01 V; viteză de baleiaj: 0.05 V/s; număr cicluri: 5.

În cazul reducerii electrochimice a GO prin intermediul CV (Fig. 6 C), parametrii setați sunt următorii: interval de curent: 2  $\mu$ A – 1 mA; t echilibru: 0 s; E început: 0 V; E vârf 1: -1.5 V; E vârf 2: 0 V; E pas: 0.01 V; viteză de baleiaj: 0.1 V/s; număr cicluri: 5.

Detecția moleculelor țintă ALP și RUNX2 s-a realizat prin tehnica CV (Fig. 6 D) în soluție electrolit 0.1 M KCl ce conține 1 mM  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ , setând următorii parametri: interval de curent: 2  $\mu$ A – 1 mA; t echilibru: 0 s; E început: - 0.2 V; E vârf 1: + 0.6 V; E vârf 2: -0.2 V; E pas: 0.01 V; viteză de baleiaj: 0.05 V/s; număr cicluri: 3, și prin tehnica EIS pentru care parametrii optimi au fost determinați ca fiind: interval de curent: 1  $\mu$ A – 5 mA; t echilibru: 0 s; tip scanare: potențial fix; E dc: 0 V; E ac: 0.01 V, tip frecvență: scanare; n frecvențe: 41; frecvență max.: 100000 Hz; frecvență min: 0.016 Hz; t min. eșantionare: 0.5 s; t max. echilibru: 5 s.

Tabel 1. Parametrii electrochimici optimi pentru efectuarea măsurătorilor CV prin intermediul pontejiostatului miniaturizat Sensit Smart, conectat la telefonul mobil.

Parametri	Soluție electrolit	0.1 M HCl	0.1 M PBS	0.5 M KCl	1 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ , 0.1 M KCl
	interval de curent		2 $\mu\text{A}$ –1 mA	2 $\mu\text{A}$ –1 mA	6 $\mu\text{A}$ –1 mA
t echilibru		0 s	0 s	0 s	0 s
E început		+ 0.5 V	0 V	0 V	- 0.2 V
E vârf 1		+ 0.5 V	+ 2 V	- 1.5 V	+ 0.6 V
E vârf 2		- 1.5 V	0 V	0 V	- 0.2 V
E pas		0.01 V	0.01 V	0.01 V	0.01 V
viteză de baleiaj		0.05 V/s	0.05 V/s	0.1 V/s	0.05 V/s
număr cicluri		5	5	5	3

Măsurători efectuate cu dispozitivul portabil sunt prezentate în format video pe website-ul proiectului (<https://reosteokit.chimie.upb.ro/video.html>).

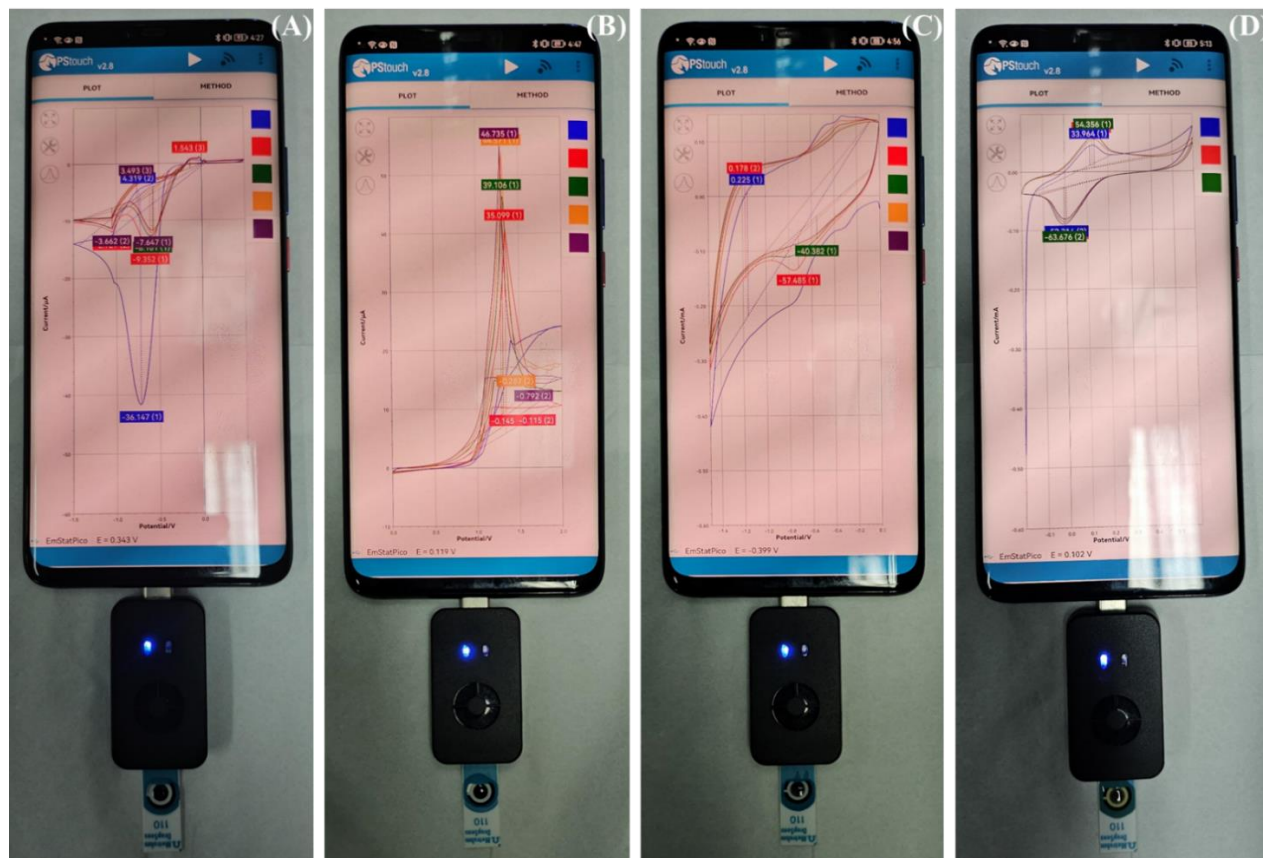


Figura 23. Măsurători electrochimice realizate cu minipotențiostatul portabil conectat la telefonul mobil: CV în prezență de HCl (A) și PBS (B) realizat pe SPCE nemodificată; reducerea electrochimică a GO după pe SPCE (C); detecția analitului prin tehnica CV (D).

Limitările impuse de metodele convenționale de substituire tisulară, bazate pe utilizarea autogrefelor și alogrefelor, au favorizat dezvoltarea bioprintării 3D și printării 4D, ambele



metode fiind abordate în proiectul REOSTEOKIT: obținerea de **Ink-uri / Cerneluri încărcate cu celule** fiind una dintre activitățile propuse. Astfel, s-au obținut două formulări printabile, una ranforsată doar cu CNF-uri și una dublu ranforsată cu CNF-uri și rGO-NH<sub>2</sub>. Pentru obținerea formulării printabile dublu ranforsate s-a folosit o soluție de 5 ml cu o concentrație de 10 % CNF și 0.05 % rGO-NH<sub>2</sub>, care a fost ultrasonată timp de două ore. Pentru formularea control s-a utilizat o soluție de 5 mL conținând doar 10% CNF. În soluțiile obținute s-a adăugat o concentrație 30% GelMA și 0.5% fenil-2,4,6-trimetilbenzoilfosfinat de litiu (LAP) (raportat la cantitatea de GelMA) sub agitare magnetică la 40°C. Anterior, cultura celulară MG-63 a fost menținută în condițiile standard de incubare, la 37°C și 5% CO<sub>2</sub>, în mediu de cultură Dulbecco's Modified Eagle (DMEM), suplimentat cu ser fetal bovin 10% și antibiotic penicilină-streptomicină 1%. Celulele au fost însămânțate în formularea printabilă în condiții sterile în hota cu flux laminar vertical la o densitate celulară de 10<sup>6</sup> celule/mL. Formularea conținând celule a fost transferată într-un cartuș steril și introdusă în bioimprimanta 3D BIO X6 (Cellink, Gothenburg, Suedia). Pentru a asigura sterilitatea procesului, incinta a fost sterilizată anterior cu UV timp de 30 de minute, iar bioprintarea s-a realizat direct într-o placă cu godeuri sterilă. Pentru bioprintare s-a utilizat un vârf steril cu diametrul interior de 330 μm, iar procesul s-a realizat la temperatura de 37°C, o variație a presiunii de 25-40 kPa și o viteză de 8 mm/s pentru a nu afecta celulele din formularea printabilă. Pentru fotoreticularea structurilor obținute s-a folosit o sursă UV, la o lungime de undă de 405 nm, timp de 5s după printarea fiecărui strat. Structurile bioprintate au fost transferate în hotă unde au fost imersate în 1 mL DMEM suplimentat precum s-a descris anterior, iar apoi incubate în condiții standard pentru 24 de ore. Pentru a determina viabilitatea celulară în urma procesului de bioprintare s-a realizat testul Live/Dead. Astfel, s-a scos mediul de cultură din godeurile conținând probele și s-au spălat cu soluție salină cu fosfat. În fiecare godeu s-a adăugat câte 1 mL de soluție cu calceină-AM și etiduihomodimer pentru marcarea celulelor vii (verde) și a celor moarte (roșu). Analiza structurilor marcate s-a realizat cu ajutorul microscopului inversat cu fluorescență. Figurile 24C și 24D ilustrează efectul diferitelor valori ale presiunii asupra procesului de bioprintare. Presiunea scăzută este favorabilă într-un proces de bioprintare întrucât nu induce factori de stres suplimentari asupra celulelor în timpul extrudării. Se poate observa îmbunătățirea fidelității de printare pentru probele ranforsate cu rGO-NH<sub>2</sub> și prezența unui număr mai redus de bule de aer în aceste structuri (Figurile 24E și 24F) în ciuda faptului că ambele formulări au fost centrifugate în aceleași condiții (1300 rpm, 3 min) anterior însămânțării celulare.

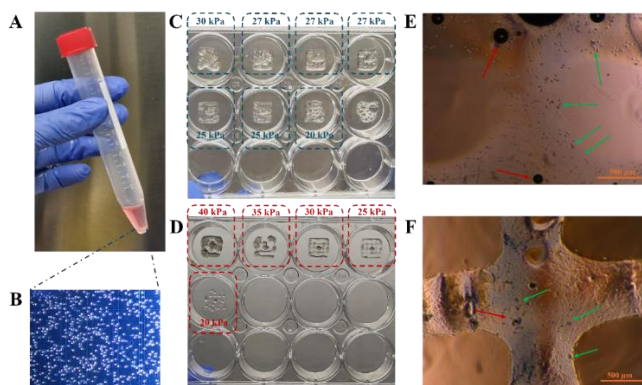


Figura 24. Bioprintarea structurilor 3D însămânțate cu celule MG-63; Cultura celulară după desprindere cu tripsină și centrifugare (A); Imagine microscopică a celulelor în camera de numărare (B); Structurile control bioprintate la diferite presiuni (C); Structurile ranforsate cu rGO-NH<sub>2</sub> și bioprintate la diferite presiuni (D); Imagini microscopice ale unei probe control după bioprintare și imersare în mediu celular (E); Imagini microscopice ale unei probe

ranforsate cu rGO-NH<sub>2</sub> după bioprintare și imersare în mediu celular (F); Celule cuprinse în structură (săgeată verde); Bule de aer (săgeată roșie).

Analiza structurilor bioprintate după 24 de ore de incubare în condiții standard prin intermediul marcării fluorescente Live/Dead (Fig. 25) a indicat o viabilitate celulară crescută, indicând că atât formularea propusă, cât și protocolul de bioprintare (presiunea, temperatura și diametrul vârfului) sunt corecte și nu au indus forțe suplimentare asupra celulelor în timpul extrudării.

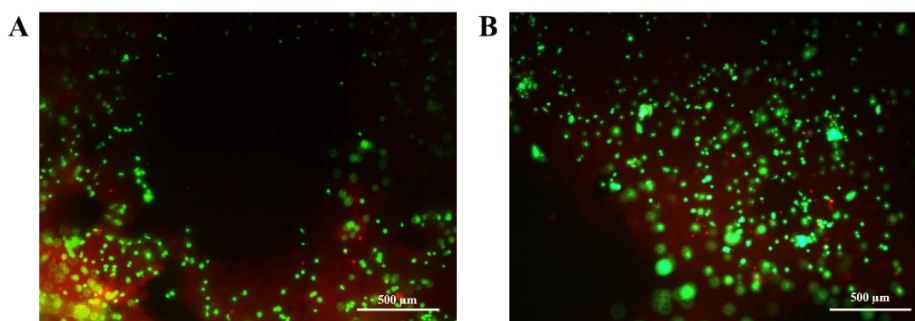


Figura 25. Imagini de fluorescență ale structurilor control (A) și ranforsate cu rGO-NH<sub>2</sub> (B) după 24 de ore de incubare pentru vizualizarea celulelor vii (verde) și moarte (roșu).

**Dezvoltarea de ink-uri / cerneluri actinice** este o altă activitate științifică a proiectului REOSTEKIT și în această direcție a fost realizată sinteza gelatinei conjugate cu furfurilamină. În scopul modificării cu furfurilamină, 10 g de gelatină de pește (G) au fost dizolvate în 250 mL soluție de acid acetic (pH 5) la 40°C și agitată mecanic timp de 2 ore în vederea obținerii unei soluții omogene. După 2 ore, cantități echimolare (8 mmol) de EDC, NHS și furfurilamină (FAM 20 mmol) au fost adăugate peste această soluție de gelatină sub agitare continuă, iar suspensia rezultată a fost agitată suplimentar timp de 24 de ore la 40°C, ferit de lumină. Ulterior, suspensia a fost purificată timp de 2 zile folosind un săculeț de membrană de dializă (MW: 14000) și a fost liofilizată pentru a obține gelatină conjugată cu furfurilamină (GFam). Liofilizarea a avut loc după congelarea (-18 °C) soluției rezultate la -60 °C, 0.01 mbar, timp de 48 de ore.

Figura 26 ilustrează spectrele FTIR ale gelatinei și gelatinei modificate. Atât gelatina pură, cât și gelatina modificată, prezintă un puternic maxim de absorbție a amidei I în jurul valorii de 1650 cm<sup>-1</sup>, asociat cu vibrațiile de întindere a legăturilor carbonil (C=O) din structura proteinei. De asemenea, se remarcă prezența maximelor caracteristice pentru amida II, la valoarea de 1542 cm<sup>-1</sup>, și amida III la 1237 cm<sup>-1</sup>. Amida II reflectă îndoirea și întinderea legăturilor N-H și C-N din structura peptidică, în timp ce maximele pentru amida III sunt datorate combinării dintre aceste două tipuri de vibrații din cadrul grupării amide. Proba G prezintă o intensitate mai mare a acestor vârfuri întrucât gelatina nu este modificată. Introducerea grupărilor furfuril duce la schimbări în intensitatea benzilor. Prezența grupărilor furfuril este evidențiată prin apariția unui maxim de absorbție în jurul valorii de 1500 cm<sup>-1</sup> datorat vibrațiilor de întindere ale legăturilor C=C în inelul furan. De asemenea, prezența unui maxim în această regiune poate indica și formarea de noi amide (vibrații de întindere C-N) în urma reacției de cuplare EDC/NHS.

Pe baza gelatinei conjugate cu furfurilamină s-a realizat sinteza hidrogelurilor actinice. GFam a fost solubilizată în PBS pentru obținerea unei soluții de concentrații 15% (m/v). S-a

urmărit obținerea a trei compoziții fotoreticulabile, cu eozină Y la 532 nm (EY), riboflavină (RB) la 450 nm și una hibridă (EY\_RB). Fotoinițiatorii au fost adăugați în raport de 0.22:100 (eozină), 0.11:100 (riboflavină), iar în compoziția hibridă 0.2 (0.1+0.1):100 față de cantitatea de GFam. Trietanolamina (coinițiator) și N-vinilpirolidona (comonomer) au fost pre-solubilizate în soluția de PBS în raport de 1:100 față de GFam. Figura 27 ilustrează reprezentarea ternară a rezultatului optimizării concentrațiilor de foto-(co)-inițiatori și comonomeri efectuate în vederea sintezei materialelor actinice, în ceea ce privește rapoartele masice interdependente. Fotoreticularea a fost efectuată sub agitare constantă a soluției până la formarea gelurilor. Sursele luminoase (2W 450 nm / 5W 325 nm) au fost plasate la o distanță de 10 cm față de soluție (Fig. 28), rezultând o energie totală de inducere a procesului de reticulare cuprinsă între 1.2 – 3 kJ/cm<sup>2</sup>.

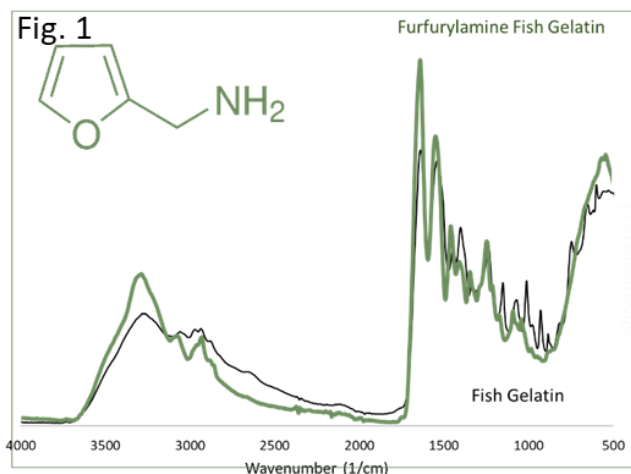


Figura 26. Spectrele FTIR ale gelatinei de pește și gelatinei modificate cu furfurilamină.

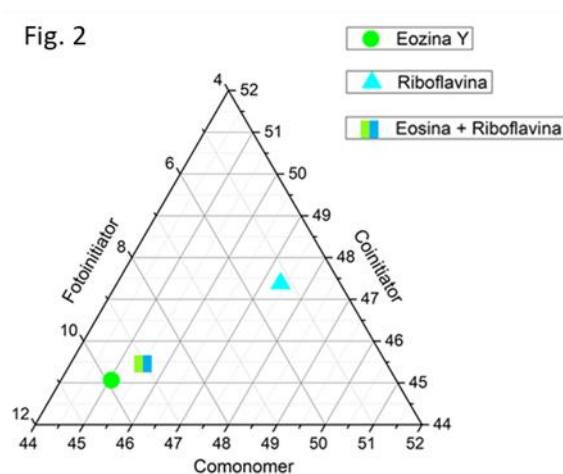


Figura 27. Diagrama ternară a componentelor fotoactive actinice pentru sistemele REOSTEOKIT dezvoltate.

Figura 29 ilustrează spectrele FTIR ale celor trei hidrogeluri rezultate. Banda de absorbție ascuțită de la 1250 cm<sup>-1</sup> din spectrul GFam se splitază ca urmare a fotoreticulării cu eozina, rezultând două semnale distincte emergente, asociate formării amidei III, atât între lanțurile de polimer, cât și între gelatină și NVP. Cele două semnale apar și în spectrul formulării reticulate cu riboflavină și în cea hibridă, însă intensitățile lor se schimbă, iar semnalele lor contribuie la formarea unei benzi mai largi și mai puțin definite decât în cazul reticulării cu eozină. Semnele de la 1000 – 1200 cm<sup>-1</sup> (întinderi C-O și C-N, precum și vibrații ale lanțurilor laterale ale aminoacizilor) suferă un fenomen de *red-shift* ca urmare a reticulării. Reticularea scade flexibilitatea rețelei, ceea ce poate restricționa libertatea vibrațională a grupărilor funcționale, conducând la frecvențe vibraționale mai mari (numere de undă mai mari, fenomen observat și în cazul semnalelor specifice amidei I și II din spectrele fotoreticulate. În mod similar, reducerea sau restricționarea legăturilor de hidrogen modificate poate altera frecvențele specifice.

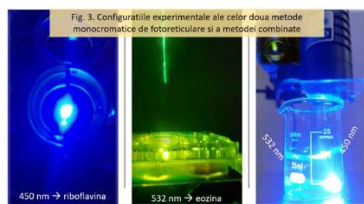


Figura 28. Configurările experimentale ale celor 3 moduri actinice de fotoreticulare.

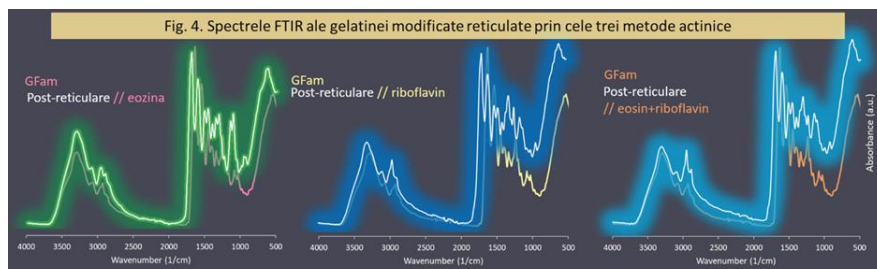


Figura 29. Spectrele FTIR ale gelatinei de pește modificată cu furfurilamină și reticulate actinic.

Comportamentul de gonflare al hidrogelurilor a fost monitorizat pe o durată de până la 10 ore, iar rezultatele sunt ilustrate în Fig. 30A. Hidrogelul reticulat cu EY a prezentat cea mai mare capacitate de gonflare, demonstrând astfel o absorbție superioară a apei. Cu toate acestea, deși atinge un vârf de absorbție în jurul timpului de 500 minute, nu ajunge la echilibru și începe să se degradeze. Hidrogelul reticulat cu RB a înregistrat valori intermediare ale gradului de gonflare, caracterizate printr-o creștere rapidă inițială, însă fără a depăși 60% la ultimul punct de măsurare, moment în care a început degradarea. În cazul hidrogelului fotoreticulat hibrid, creșterea gradului de gonflare a fost mai lentă și cu valori semnificativ mai mici, indicând o absorbție redusă de apă. Degradarea acestuia a fost mai puțin pronunțată comparativ cu celelalte probe, aspect ce poate fi atribuit unei densități de reticulare mai mari, datorată combinației celor două mecanisme de reticulare utilizate simultan. Cinetica de gonflare evidențiază o viteză maximă de absorbție pentru proba EY, având o pantă semnificativ mai abruptă față de celelalte probe. Este posibil ca riboflavina și utilizarea concomitentă a cuplului riboflavină-eozină să genereze geluri cu densități de reticulare mai ridicate, care sunt mai puțin susceptibile să încorporeze cantități mari de apă.

Testele mecanice de compresiune au permis determinarea modului de elasticitate al probelor, prezentat în Fig. 30B. Rezultatele indică faptul că hidrogelul fotoreticulat cu lumină albastră în prezența RB a prezentat cea mai mare elasticitate (36 kPa), în timp ce hidrogelul reticulat cu eozină a înregistrat cea mai mică elasticitate (49 kPa). Proba hibridă a avut un comportament intermediar (45 kPa), sugerând că proprietățile mecanice pot fi ajustate prin optimizarea concentrațiilor de fotoinițiatori, pentru a răspunde unor cerințe specifice legate de elasticitate.

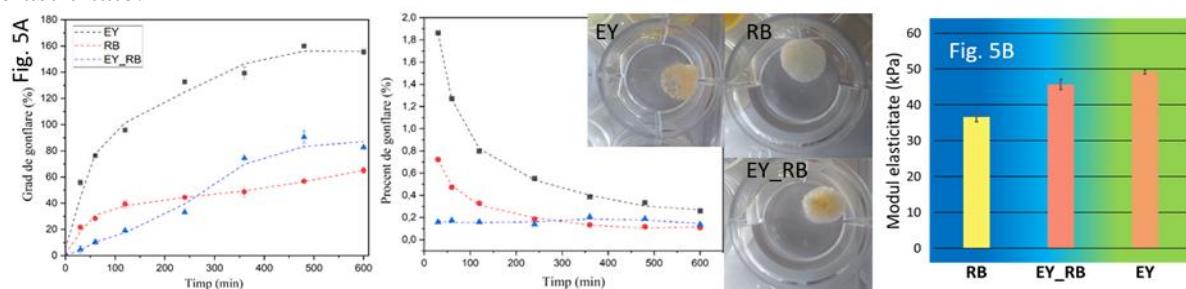


Figura 30. A. Profilul de gonflare și cinetica de gonflare; B. Modulul de elasticitate al probelor reticulate cu eozină, riboflavină, eozină și riboflavină.

Spectrul UV-Vis prezentat în Fig. 31A evidențiază prezența maximelor de absorbție atât în domeniul ultraviolet (sub 400 nm), cât și în domeniul vizibil (400-700 nm). În domeniul UV, se observă semnale puternice, indicând o absorbție puternică a fotoinițiatorilor în această

regiune. De asemenea, maximele din domeniul vizibil sugerează că acești compuși pot fi excitați și de radiația din această regiune a spectrului electromagnetic. În soluția hibridă care conține ambii fotoinițiatori, se observă o deplasare (shiftare) a maximelor de absorbție, fenomen atribuit interacțiunilor moleculare și modificărilor în structura electronică a compușilor. Spectrul acestei compoziții îmbină caracteristici din ambele regiuni spectrale, specifice eozinei și riboflavinei, dar cu pozițiile maximelor influențate de interacțiunile moleculare și de schimbările nivelurilor energetice. Spectrele UV-Vis pentru eozină și riboflavină, prezentate în Fig. 31B, 31C, respectiv 31D, arată că la intervalele de timp analizate nu mai sunt detectabile semnale în domeniul vizibil. Acest fenomen sugerează o mascarea absorbției specifice acestor fotoinițiatori, probabil din cauza interferențelor produse de fragmente de gelatină sau alte componente nereacționate (NVP), sau ca urmare a unui proces de supra-expunere a fotoinițiatorilor la radiația incidentă (fenomen de photobleaching). În spectrul UV, semnalele sunt mai intense decât cele ale soluțiilor pure de fotoinițiatori, în special pentru eozină. Această creștere a absorbției indică posibilitatea eliberării de compuși suplimentari (produși de degradare sau alte specii chimice) în timpul gonflării gelului, contribuind la absorbția în această regiune. Spectrul compusului hibrid arată absența maximelor de absorbție în domeniul vizibil.

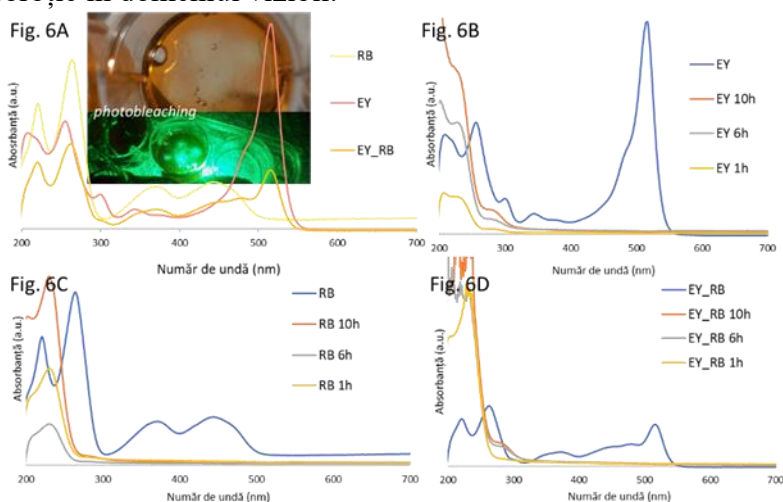


Figura 31. Spectrele UV-VIS ale fotoinițiatorilor și ale mediilor de gonflare pentru probele reticulate actinici la 1, 6 și 10 ore.

Analiza micro-CT a fost realizată pentru a evalua atât calitativ (Fig. 32A), cât și cantitativ (Fig. 32B) modificările morfologice apărute în timpul gonflării și degradării probelor sintetizate și liofilizate. Scanările au inclus probele inițiale, precum și probe după gonflare la 1, 6 și 10 ore. Rezultatele arată că toate probele prezintă inițial o structură compactă și o porozitate scăzută. După 6 ore, se observă creșteri semnificative ale porozității și semne de dezintegrare, mai accentuate la probele EY și RB, comparativ cu proba hibrid EY\_RB, care își menține mai bine integritatea structurală. La 10 ore, toate probele prezintă colaps structural pronunțat, cu o porozitate ridicată.

Analiza cantitativă a probelor inițiale a indicat o structură cu dimensiuni ale porilor de până la 600  $\mu\text{m}$  pentru EY și 475  $\mu\text{m}$  pentru RB și EY\_RB, cu distribuții diferite (uniformă pentru EY, gaussiană pentru RB și EY\_RB). După gonflare, probele tind să colapseze, iar structura devine dominată de pereți subțiri (<50  $\mu\text{m}$ ), cu distribuții largi și maxime sub 200  $\mu\text{m}$ . Aceste modificări sunt atribuite distanțării lanțurilor polimerice și degradării gelurilor, afectând stabilitatea structurală.

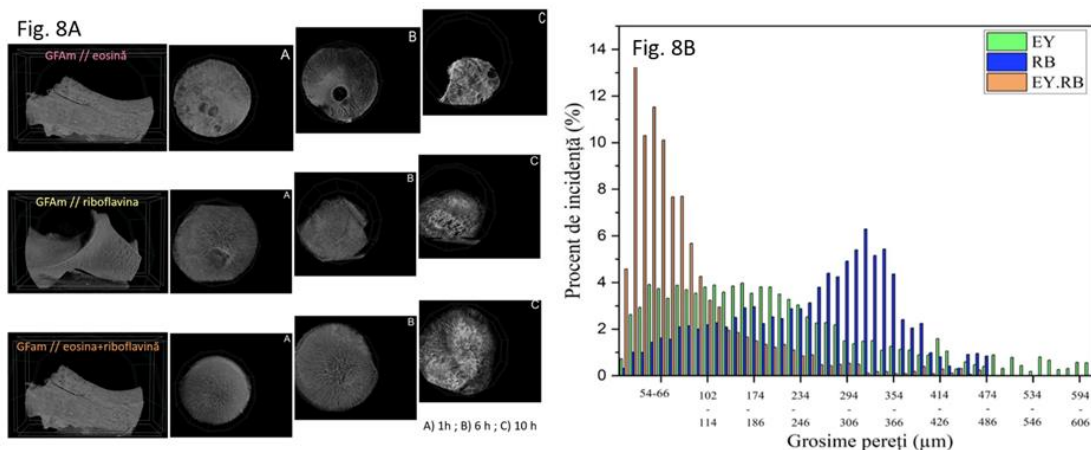


Figura 32. Analiza calitativă și cantitativă efectuată prin tehnica de micro-tomografie computerizată.

### Impactul estimat al rezultatelor obținute

Obiectivul REOSTEOKIT este îndeplinit prin dezvoltarea unui kit de reconstrucție osoasă, care îmbină soluții robuste cu eficiență îmbunătățită față de soluțiile convenționale de tratament utilizate pentru restaurarea defectelor osoase și un dispozitiv fiabil de monitorizare în timp real al potențialului osteogenic al celulelor, care oferă o măsură calitativă a formării de os prin măsurarea a doi biomarkeri importanți în regenerarea osoasă, RUNX2 și ALP, atât în laborator, cât și la locul de interes (POC). De asemenea, biosenzorul electrochimic este primul dispozitiv raportat în literatura de specialitate pentru măsurarea RUNX2 și ALP și deschide noi perspective în domeniu. În cadrul proiectului am mers un pas mai departe și am reușit integrarea biosenzorului într-un dispozitiv portabil, folosind potențiostatul Sensit Smart conectat la un telefon mobil, ceea ce permite efectuarea măsurătorilor electrochimice în timp real, la locul de interes.

În cadrul proiectului REOSTEOKIT au fost dezvoltate și caracterizate noi formulări pentru printare, bioprintare și printare 4D, care atenuază limitările metodei și ar putea contribui la creșterea potențialului de scalabilitate al acestor metode de fabricație. În același timp, acestea prezintă și complexitatea structurală, morfologică și chimică pentru medicină regenerativă - formulări printabile convenționale și reticulabile fotodinamice, dar și formulări actinice, care prezintă proprietățile necesare pentru printare 3D / 4D (proprietăți mecanice, degradabilitate, biocompatibile, proprietăți antiinflamatoare, porozitate mare cu pori interconectați), care permit fabricarea scaffoldurilor robuste cu caracteristici reproductibile, și au potențial să atingă standardele clinice și de a pune bazele de maturizare a tehnologiei.

Studiile *in vitro* indirecte au indicat viabilitatea și proliferarea celulelor precursoare foarte bună în contact cu extractul de la scaffoldurile 3D și morfologia celulară, aderența și expresia fenotipului markerilor specifici diferențierii osteogenice.

Experimentele pe animale au fost externalizate către Universitatea de Vest Vasile Goldiș Arad (Certificat ANSVSA862/05.04.2016) și au indicat că substituenții osoși, implantați subcutanat la șoareci, prezintă proprietăți osteoinductoare atât în investigații histopatologice și imunohistochimice, cât și în cele imagistice prin CT. Răspunsul osteogenic, diferențierea și mineralizarea *in vivo* au fost evidențiate și prin metode de colorare cu Alizarin red și Von Kossa.

Îndeplinirea cu succes a principalelor obiective tehnice a generat publicații în jurnale de top (**propuse 4, realizate 9 și 1 înaintat spre publicare**), prezentări la evenimente

internaționale care vizau diseminarea rezultatelor proiectului (fiecare membru al echipei de cercetare a participat la minimum 2 evenimente științifice) și susținut prin proprietatea intelectuală generată - **o cerere de brevet (propusă în cererea de finanțare 1)**. În Cererea de finanțare ne-am propus 4 lucrări publicate în jurnale ISI cu factor de impact ridicat, iar factorul de impact al lucrărilor publicate depășește 44, două dintre acestea fiind publicate în jurnale științifice cu factor de impact peste 10.

Un alt rezultat al proiectului REOSTEOKIT este formularea pe bază de alginat de sodiu-oxid de grafenă cu proprietăți optime pentru a fi utilizat pentru fabricarea de structuri (scaffolduri) pentru reconstrucția osoasă cu performanțe îmbunătățite în regenerarea osoasă, dar și cu printabilitate foarte bună. Aceste rezultate fac obiectul Cererii de brevet A/00728/23.11.2023. După procedura de brevetare ne propunem furnizarea de cunoștințe (de la echipa REOSTEOKIT) întreprinderilor cu scopul de a produce un prototip de scaffold pentru regenerare osoasă și a efectua testele clinice cu scopul ca aceste structuri prototip să fie utilizate în continuare în practica medicală, sau să constituie o bază solidă pentru dezvoltarea unor atfel de produse.

REOSTEOKIT a permis continuarea cu succes tinerilor cercetători implicați (5 cercetători tineri angajați în cadrul proiectului) să lucreze într-un domeniu multidisciplinar extrem de inovator, să-și exerseze abilitățile de cercetători, să înțeleagă rolul lor în dezvoltarea de produse noi și să contribuie la formarea și, poate, la stabilizarea resurselor umane din țară. Pe lângă rezultatele propuse prevăzute în Cererea de finanțare au fost generate și alte tipuri de rezultate precum lucrări de doctorat, lucrări de licență și dizertație.

## **Participări conferințe REOSTEOKIT – 12**

1. Elena Alina Chiticaru, Mariana Ioniță, *Advancing osteogenic biomarkers detection - an electrochemical method using reduced graphene oxide for ALP and RUNX2 analysis*, Cluj-Napoca, România, 27-28 septembrie 2024: 11th Napoca Biodent Symposium Biomimetics in Dentistry - Research and Clinical Applications – prezentare orală;
2. Mihaela Raluca Dobrișan, Mariana Ioniță, *Advanced double crosslinked formulations for 3D printing bone tissue regeneration scaffolds*, Cluj-Napoca, România, 27-28 septembrie 2024: 11th Napoca Biodent Symposium Biomimetics in Dentistry - Research and Clinical Applications – prezentare orală;
3. Elena Cojocaru, Mariana Ioniță, *Emerging Treatment Strategies for Multiple Myeloma (MM) and Myeloma Bone Damage Reversed*, Constanța, România, 4-7 septembrie 2024: 23rd Romanian International Conference on Chemistry and Chemical Engineering (RICCCE 23) – prezentare poster;
4. Mihaela Raluca Dobrișan, Mariana Ioniță, *3D Printing of Cellulose Fiber-loaded Gellan/Gelatin Inks Reinforced with Graphenic Allotropes Reliable for Tissue Engineering Structure*, Constanța, România, 4-7 septembrie 2024: 23rd Romanian International Conference on Chemistry and Chemical Engineering (RICCCE 23) – prezentare poster;
5. George Mihail Vlăsceanu, Loredana Batagui, Andrada Serafim, Mariana Ioniță, *Visible light-driven hydrogels for tissue engineering*, Constanța, România, 4-7 septembrie 2024: 23rd Romanian International Conference on Chemistry and Chemical Engineering (RICCCE 23) – prezentare orală;
6. George Mihail Vlasceanu, Andrada Serafim, Alin Georgian Toader, Mariana Ionita, *Causal Links between Composition-Mechanics-Architecture Fluidity in Double-Reinforced Fish*

- Gelatin Composite Scaffolds, Istanbul, Turcia, 8 – 14 iulie 2023: 19th Asian Chemical Congress (ACC 2023) – prezentare poster;
7. Georgian Alin Toader, Elena Cojocaru, Mariana Ioniță, *Process for Fabricating 3D Printed Scaffolds Based on Sodium Alginate and Graphene Oxide for Personalized Tissue Engineering*, Daegu, Coreea, 26-31 mai 2024: 13th World Biomaterials Congress (WBC 2024) – prezentare poster;
  8. Mariana Ioniță, *Graphene Based Inks for 3d-printed Scaffold for Bone Tissue Engineering*, Italia, Florența, 21-24 martie 2024: 2nd International Conference and Expo on 3D Printing and Additive Manufacturing – prezentare orală, lucrare plenară;
  9. Mariana Ioniță, Elena Alina Chiticaru, *A novel approach in bone regeneration and detection of ALP and RUNX2 osteogenic biomarkers*, Seville, Spania, 6-8 martie 2024: Polymers 2024, Composites 2024 and 3Bs Materials 2024 International Joint Conferences – prezentare orală;
  10. Alexandra Ioana Cernencu, George Mihail Vlăsceanu, Mariana Ioniță, *3D printing of multi-layered graphene oxide – hydrocolloid composite hydrogels*, Oludeniz, Turcia, 13-19 octombrie 2022: 12th International Advances in Applied Physics & Materials Science Congress & Exhibition (APMAS 2022) – lucrare invitată;
  11. Mariana Ioniță, Elena Alina Chiticaru, George Mihail Vlăsceanu, Georgian Alin Toader, *Graphene-based nanomaterials for bone tissue engineering*, Sinaia, România, 7-9 septembrie 2022: 22nd Romanian International Conference on Chemistry and Chemical Engineering (RICCCE 22) – prezentare orală;
  12. Alexandra Ioana Cernencu, George Mihail Vlăsceanu, Horia Iovu, Mariana Ioniță, *Design of Graphene Oxide – Colloid composite hydrogels with controlled architecture and multifunctionality*, Sinaia, România, 7-9 septembrie 2022: 22nd Romanian International Conference on Chemistry and Chemical Engineering (RICCCE 22) – prezentare poster;
  13. Mariana Ioniță, *Graphene-based biomaterials: opportunities, perspectives, and challenges*, București, România, 20-22 iulie 2022: 9th International Conference Biomaterials, Tissue Engineering & Medical Devices (BIOMMEDD'2022) – lucrare invitată.

### **Articole Proiect REOSTEOKIT – 9 publicate, 1 înaintat spre publicare**

1. Alexandra Ioana Cernencu, George Mihail Vlăsceanu, Andrada Serafim, Grațiela Pircalabioruc, Mariana Ioniță; 3D double-reinforced graphene oxide – nanocellulose biomaterial inks for tissue engineered constructs; Jurnal RSC Advances; Volum 13; Pagini 24053-24063; 2023; Factor de impact: 3.9 (Q2); WOS:001045110000001;
2. Alin Georgian Toader, George Mihail Vlăsceanu, Andrada Serafim, Adela Banciu, Mariana Ioniță; Double-Reinforced Fish Gelatin Composite Scaffolds for Osteochondral Substitutes; Jurnal Materials; Volum 16; Pagini 1815-1833; 2023; Factor de impact: 3.1 (Q2); WOS:000947823100001;
3. Alexandra Ioana Cernencu, Mariana Ioniță; The current state of the art in gellan-based printing inks in tissue engineering; Jurnal Carbohydrate Polymers; Volum 309; Pagini 120676-120690; 2023; Factor de impact: 10.7 (Q1); WOS:000944256100001;
4. Elena Alina Chiticaru, Celina Maria Damian, Luisa Pilan, Mariana Ioniță; Label-Free DNA Biosensor Based on Reduced Graphene Oxide and Gold Nanoparticles; Jurnal Biosensors; Volum 13; Pagini 797-811; 2023; Factor de impact: 4.9 (Q1); WOS:001119086400001;
5. Georgian Alin Toader, Florentin R. Nițu, Mariana Ioniță; Graphene Oxide/Nitrocellulose Non-Covalent Hybrid as Solid Phase for Oligo-DNA Extraction from Complex Medium;



- Jurnal Molecules Volum 28; Pagini 4599-4612; 2023; Factor de impact: 4.2 (Q1); WOS:001017189000001;
6. Elena Alina Chiticaru, Georgian Alin Toader, Mariana Ioniță; Towards Point-of-Care Medical Applications Using Electrochemical Biosensors; Jurnal University POLITEHNICA of Bucharest, Scientific Bulletin, Series B-Chemistry and Materials Science; Volum 86; Pagini 59-70; 2024; Factor de impact: 0.3 (Q4); WOS:001196525500002;
  7. Elena Alina Chiticaru, Mariana Ioniță; A Novel Approach Using Reduced Graphene Oxide for the Detection of ALP and RUNX2 Osteogenic Biomarkers; Jurnal Current Issues in Molecular Biology; Volum 46; Pagini 4489-4505; 2024; Factor de impact: 2.8 (Q2); WOS:001233618000001;
  8. Mihaela-Raluca Dobrișan, Adriana Lungu, Mariana Ioniță; A review of the current state of the art in gelatin methacryloyl-based printing inks in bone tissue engineering; Jurnal Virtual and Physical Prototyping; Volum 19; e2378003 (32 de pagini); 2024; Factor de impact: 10.2 (Q1); WOS:001274223400001;
  9. Elena Cojocaru, Mădălina Oprea, George Mihail Vlăsceanu, Mădălina-Cristina Nicolae, Roxana-Cristina Popescu, Paul-Emil Mereuță, Alin-Georgian Toader, Mariana Ioniță; Dual nanofiber and graphene reinforcement of 3D printed biomimetic supports for bone tissue repair; Jurnal RSC Advances Volum 14; Pagini 32517-32532; 2024; Factor de impact: 3.9 (Q2); WOS:001334589900001.
  10. George Mihail Vlăsceanu, Cătălina Ionela Zamfir, Mariana Ioniță, Anca Hermenean; The role of functionalization charges in graphene nanocomposites for bone regeneration, înaintată spre publicare la Scientific Reports, 2024

### **Cerere de brevet înaintată către OSIM**

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” nr. de înregistrare A/00728/23.11.2023.

Data,

26.11.2024

Director de proiect, Dr. ing. Mariana Ioniță

