

Denumirea proiectului: *Arhitecturi hibride 3D bioinspirate pentru repararea și regenerarea în profunzime a pielii (BioHySkin)*

Cod proiect PN-III-P2-2.1-PED-2021-3003

Contract nr. 613/2022

Etapa I. Prepararea amestecurilor și teste pentru realizarea de suporturi 3D prin metode reproductibile

Scopul etapei I a proiectului l-a constituit realizarea de amestecuri polimerice care pot fi transformate, prin diferite metode și tehnici (reticulare, liofilizare, bioimprimare), în suporturi capabile să susțină adeziunea și proliferarea celulară (celule specifice pielii).

Activitățile propuse în cadrul etapei I au fost realizate integral, prin corelarea aspectelor științifice și tehnice pe parcursul perioadei de derulare.

Activitate I.1. Obținerea de amestecuri fără celule pentru realizarea de suporturi 3D

Modificarea chimică a gelatinei. Gelatina a fost modificată conform protocolului descris de Camci-Unal și colaboratori săi, aducând unele ajustări metodei. Pentru cuantificarea gradului de metacrilare s-au utilizat 2 metode: metoda TNBS și metoda cu ninhidrină. S-a obținut GelMA cu grade de substituție cuprinse între 52% și 66%, în funcție de timpul reacției de modificare chimică.

Prepararea și caracterizarea amestecurilor cu GelMA. S-au realizat amestecuri pe bază de gelatină metacrilată (GelMA), cu diferite grade de metacrilare și poli(etilen glicol) diacrilat pentru utilizare ca biocerneluri imprimabile prin tehnica de extrudare. S-au realizat amestecuri omogene pe bază de GelMA, PEGDA, fotoinițiator biocompatibil; amestecurile s-au caracterizat din punct de vedere reologic. Testele reologice au fost efectuate cu ajutorul unui reometru MCR 302 Anton-Paar (Graz, Austria), echipat cu sistem Peltier pentru controlul temperaturii. Pentru toate amestecurile, modulul elastic (G') prezintă valori mai mari în comparație cu modulul vâscos (G''), iar valorile tangentei de pierdere sunt mai mici decât unitatea. Comportamentul reologic al materialelor GelMA este influențat atât de adăugarea polimerului PEGDA cât și de gradul de metacrilare. În toate cazurile, gelurile care încorporează două tipuri diferite de polimeri (gelatina funcționalizată și PEGDA) sunt rețele cu proprietăți reologice superioare în condiții de forfecare continuă. Materialele pe bază de GelMA, reticulate cu PEGDA, sunt formulări de biomaterial asemănătoare structurilor solide, fiind adecvate pentru bioimprimarea pe bază de extrudare.

Activitate I.2. Obținerea de amestecuri cu celule pentru hidrogeluri și bioimprimare

Pentru obținerea biocernelurilor cu celule s-a dizolvat GelMA în DMEM complet (10% ser fetal bovin și 1% amestec de penicilină, streptomycină și neomicină) la temperatura camerei pentru a prepara o soluție de concentrație 20% (g/vol), după care a fost filtrată. S-a adăugat cantitatea corespunzătoare de PEGDA și fotoinițiator. În gelul format s-a adăugat 1 mL de DMEM complet cu suspensie de fibroblaste (1×10^7 celule). Biocerneala obținută s-a introdus în seringă imprimantei 3D, iar imprimarea s-a realizat într-o placă de cultură cu 48 de godeuri. După procesul de bioimprimare, în fiecare godeu au fost adăugați 500 μ l de DMEM complet și sistemele au fost incubate la 37°C, în atmosferă de 5%CO₂ timp de 48 de ore.

Pentru comparație, din amestecul initial s-a realizat suport prin bioimprimare și s-a supus populării cu celule. Atât în cazul suporturilor obținute prin imprimarea amestecurilor polimerice în care au fost incorporate celule cât și în cazul suporturilor populate ulterior cu celule se observă existența celulelor după 48 h de cultură. Rezultatele sunt promițătoare, în etapa a IIa a proiectului urmând a se realizeze studii suplimentare în vederea îmbunătățirii capacității de încorporare a celulelor.

Activitate I.3 Teste preliminare privind obținerea de suporturi de tip hidrogel și sisteme realizate prin bioimprimare

I.3.1. Realizarea de suporturi tip hidrogel prin reticulare

S-au realizat hidrogeluri reticulate prin combinarea de polimeri naturali (chitosan, gelatină, dextran și xantan) și polimeri sintetici (poli(acrilamidă) și poli(N,N'-metilen-bisacrilamidă)). S-a studiat influența metacrilării polimerilor naturali și adaosul de monomeri sintetici (acrilamidă (Aam) și N,N'-metilen-bisacrilamidă (BisAam)) în compoziție asupra proprietăților hidrogelurilor obținute.

I.3.2. Realizarea de suporturi prin bioimprimare

Amestecurile obținute la Activitatea I.1. au fost imprimate folosind o bioimprimantă 3D Inkredible (Cellink, San Carlos, Statele Unite) care utilizează metoda extrudării ca mecanism de injectare a cernelurilor. Structuri cu formă pătrată și grile (1×1cm), având 4 straturi grosime au fost proiectate în programul CellInk Heartwave și extrudate printr-o duză conică 27G (dimensiune de 200μm). Parametrii de imprimare au fost selectați în corelație cu vâscozitatea fiecărui amestec. Matricile obținute prin tehnica de bioimprimare au fost uscate prin liofilizare (Labconco, SUA), timp de 48 de ore și supuse caracterizării.

Activitatea I.4 Caracterizarea suporturilor tip hidrogel și bioimprimare

Hidrogelurile obținute prin reticulare au fost caracterizate din punct de vedere structural, morfologic, al proprietăților de interacțiune cu fluide biologice simulate, citocompatibilității. Studiul compoziției chimice a confirmat polimerizarea monomerilor sintetici în prezența grupărilor metacrilice de pe polimerii naturali și formarea de rețele tridimensionale. Hidrogelurile prezintă o compoziție omogenă și formează prin liofilizare structuri macroporoase, cu porii interconectați, caracteristici deosebit de importante pentru interacțiunea cu celule și nutrienți. Hidrogelurile au o bună capacitate de umflare, în condiții biologice simulate atingându-se grade de umflare > 2000%. Testele în culturi celulare au arătat faptul că suporturile sunt citocompatibile și nu induc modificarea morfologiei celulare. Suporturile obținute prin tehnica de bioimprimare au fost liofilizate și supuse caracterizării. În condiții fiziologice simulate, suporturile 3D obținute absorb fluide și stabilitatea lor a crescut în prezența PEGDA. Suporturile sunt degradate în prezența collagenazei; gradul de metacrilare și poziția grupului metacrilat pe catena gelatinei influențează reacția cu PEGDA și complexitatea structurii 3D, implicit comportarea la degradare. S-au realizat teste în culturi celulare (fibroblaste și keratinocite) și s-a arătat că materialele GelMA-PEGDA sunt biocompatibile și nu au modificat morfologia și capacitatea de proliferare a celulelor. De asemenea, materialele sunt bioadezive, proprietățile fiind îmbunătățite semnificativ atunci când PEGDA a fost implicat în formarea rețelei 3D.

Activitatea I.5. Management proiect, raportare etapa.Diseminarea rezultatelor

Rezultatele experimentale din cadrul proiectului au fost diseminate astfel:

Lucrări publicate în reviste cotate ISI

1. Ghilan A., Nita L.E., Pamfil D., Simionescu N., Tudorachi N., Rusu D., Rusu A.G., Bercea M., Rosca I., Ciolacu D.E., Chiriac A.P., One-Step Preparation of Carboxymethyl Cellulose-Phytic Acid Hydrogels with Potential for Biomedical Applications, GELS, 8(10), 647. (IF=4.432)

Lucrări publicate la conferințe indexate ISI

1. Baiu T., Nacu I., Niță L.E., Verestiuc L., 3D Bioprinted methacrylated gelatin-based scaffolds, acceptata in volumul indexat ISI; the 10th IEEE International Conference on E-Health and Bioengineering - EHB 2022; November 17-19, 2022, Romania

Lucrări prezentate la conferințe internaționale

1. Baiu T., Nacu I., Niță L.E., Verestiuc L., 3D Bioprinted methacrylated gelatin-based scaffolds; the 10th IEEE International Conference on E-Health and Bioengineering - EHB 2022; November 17-19, 2022, Romania
2. Verestiuc L., Mihoc B., Vasiliu A., Butnaru M., Zagnat M., Aloe vera extracts - based scaffolds for wound dressing applications, Conference on Natural Products in Drug Discovery and Development – Advances and Perspectives, Iasi, Romania, September 19 – 22, 2022.
3. Sibechi M.G., Laslau S.A., Ditu I.P., Nacu I., Butnaru M., Verestiuc L., Olive leaf extracts in green synthesis of ag nanoparticles for wound dressing materials, Conference on Natural Products in Drug Discovery and Development – Advances and Perspectives, Iasi, Romania, September 19 – 22, 2022.
4. Nacu I., Nedelcu L., Nita L.E., Verestiuc L., 3D bioprinted hybrid hydrogels based on GelMA and functionalised biopolymers for tissue engineering, The 26th Biomedical Science and Technology Symposium, organizat de Biomaterials and Tissue Engineering Society (BTES – Turkey), Online, 25-27 Nov, 2022.

Bibliografie selectivă. N.Poomathi, S.Singh, C.Prakash, A.Subramanian, R.Sahay, A.Cinappan, S. Ramakrishna, Rapid Prototyp.J., 26 (2020), pp. 1313-1334; S.S.Mahdavi, M.J.Abdekhodaie, S.Mashayekhan, A.B.Rafii, K.Kim, Mater. Today Commun., 27(2021),102459 G.Camci-Unal, D.Cuttica, N.Annabi, D.Demarchi, A.Khademhosseini, Biomacromolecules, 14(2013) 1085–1092; Z.Shen, Y.Cao, M.Li, Y.Yan, R.Cheng, Y.Zhao, Q.Shao, J.Wang, S.Sang, Mater.Sci.Eng.C, 129(2021), 112360; K.R.Mamaghani, S.M.Naghib, A.Zahedi, M.Mozafari, Mater. Today: Proc., 5 (2018), 15635–15644; K.D.Silva, P.Kumar, S.F.Vuuren, V.P.Viness, P.Wits, Y.E.Choonara, American Chemical Society, 6(2021), 2470-1343; S.Sreekumaran, A.Radhakrishnan, A.A.Rauf, G.M. Kurup, Prog. Biomater, 10(2021), pp. 43–51; F.Nazir, I.Ashraf, M.Iqbal, T.Ahmad, S.Anjum, Int.J.Biol.Macromol., 185 (2021), pp. 419-433; L.Lemarié, A.Anandan, E.Petiot, C.Marquette, E.-J.Courtial, Bioprinting 21 (2021) e00119; M.A.Sakr, K.Sakthivel, T.Hossain, S.R.Shin, S.Siddiqua, J.Kim, K.Kim, J.Biomed.Mater. Res. A., 110(2021), 708-724; G.Zu, M.Meijer, O.Mergel, H.Zhang, P.van Rijn, Polymers, 13(2021), 2508; T.Jain, H.B.Baker, A.Gipsov, J.P.Fisher, A.Joy, D.S.Kaplan, I.Isayeva, Bioprinting, 22(2021), e00131; J.D.Smart, Adv.Drug.Deliv. Rev. 57(2005), 1556–1568; J.Horakova, P.Mikes, A.Saman, T.Svarcova, V.Jencova, T.Suchy, B.Heczko, S.Jakubkova, J.Jirousova, R.Prochazkova, Mater. Sci. Eng. C, 82(2018), pp.330-335; Y.Yu, R.Cui, X.Wang, H.Yang, H.Li Int. J. Biol. Macromol., 155(2020), pp.14-26.