

DENUMIREA PROIECTULUI: eBio-hub: Centrul de Cercetare în Inginerie Biomedicală

CONTRACTOR: Universitatea Națională de Știință și Tehnologie Politehnica București

PROGRAMUL: Cooperare Europeană și Internațională

SUBPROGRAMUL: Premiere Orizont Europa – Instituții

COD PROIECT: PN-IV-P8-8.1-PRE-HE-ORG-2023-0054

CONTRACT DE FINANȚARE: 17PHE/2023

Etapa 3: Dezvoltarea unor platforme tehnologice pentru bioinginerie -2

Etapa 3, conform planului de realizare include următoarele activități:

- **Activitate 3.1** Dezvoltarea unor tehnologii de autoasamblare a nanoparticulelor pentru terapie genetică;
- **Activitate 3.2** Testarea in vitro a plasturilor personalizați cu microace folosind matrițe generate prin printare 3D
- **Activitate 3.3** Dezvoltarea unui tehnologii pentru printare 3D a modelului de piele folosind fibroblaste; Efectuarea unuia sau mai multor stagii practice / formare în străinătate la institute de cercetare/universități de renume de către membrii echipei proiectului; Activități de diseminare și comunicare a rezultatelor generate în cadrul proiectului prin participarea tuturor membrilor echipei proiectului la manifestări științifice naționale sau internaționale (conferințe).

Rezultate livrate – etapa 3/2025:

- Protocol pentru autoasamblarea nanoparticulelor pentru livrare de medicamente
- Protocol pentru fabricare a plasturilor personalizați cu microace prin printare directă 3D (stereolitografie)
- Protocol pentru fabricarea în câmp acustic (SAW) unui model complex de piele folosind fibroblast și keratinocite
- Actualizare pagina web proiect: <https://ebio-hub.upb.ro/premiere-he/>
- Întocmire raport științific pentru Etapa 3/2025

Stagii practice / formare în străinătate la institute de cercetare/universități de renume:

1. Stagiul practic în cadrul Laboratoire de Physique des Solides, Université CNRS, Paris-Saclay, Orsay, Franța, perioada 11-15 mai 2025, efectuat de către FS. Iliescu, cercetător postdoctoral, membru în echipa proiectului. În cadrul stagiului s-au desfășurat discuții și schimburi de experiență în domeniul livrării transdermale de medicamente. De asemenea, au fost efectuate investigații morfologice ale microacelor fabricate prin printare 3D, precum și diverse activități de laborator dedicate optimizării acestor sisteme transdermice.
2. Stagiul practic în cadrul Laboratoire de Physique des Solides, Université CNRS, Paris-Saclay, Orsay, Franța, perioada 14-23 septembrie 2025, efectuat de către FS. Iliescu, cercetător postdoctoral, membru în echipa proiectului. În cadrul celei de-a doua vizite, au fost învățate tehnici avansate de caracterizare mecanică și structurală a microacelor fabricate prin printare 3D, interacțiunile matrice – agent terapeutic, precum și metode pentru investigarea și formularea unor noi compoziții printabile. Scopul a fost obținerea de microace cu proprietăți mecanice semnificativ îmbunătățite, fără a induce reacții inflamatorii evidente.

Activități de diseminare și comunicare

Lucrări științifice prezentate la conferințe internaționale (selecție de prezentări plenare sau orale):

1. BioRemed Conference, 16-18 October 2025, Oradea Romania "Self-adaptable microneedles patch for pain management"-F.S. Iliescu.
2. 60th International Conference On Microelectronics, Devices And Materials, 1-4 October 2025, Ljubljana, Slovenia "Sample Concentration in Paper-based Microfluidic Devices" C. Iliescu.
3. 60th International Conference On Microelectronics, Devices And Materials, 1-4 October 2025, Ljubljana, Slovenia "Biocompatible microneedles patch for antiinflammatory transdermal drug delivery " F.S. Iliescu.
4. Autumn Meeting of the Academy of Romanian Scientists "Science, Knowledge, Creativity, Spirituality" 17th-19th September 2025, Durau, Neamt, Romania "Improving Human-Machine Interaction by Epidermal Electronics and E-Skin" C. Cobianu.
5. Autumn Meeting of the Academy of Romanian Scientists "Science, Knowledge, Creativity, Spirituality" 17th-19th September 2025, Durau, Neamt, Romania „QC in Pharma and MD Industry” E. Radu.
6. Autumn Meeting of the Academy of Romanian Scientists "Science, Knowledge, Creativity, Spirituality" 17th-19th September 2025, Durau, Neamt, Romania „Electrical Bacterial Lysis with Impedimetric Monitoring” L.E. Andrei.
7. 4th International Conference on Bioengineering and Polymer Science, 2-5 iunie 2025, Brașov, Romania "CBD-loaded deformable lipid vesicles for enhanced antimicrobial therapy against S. epidermidis E. Radu.
8. 4th International Conference on Bioengineering and Polymer Science, 2-5 iunie 2025, Brașov, Romania „Thyroid Cancer Diagnosis and Treatment Challenges - The Place for AI Improvement” -M. Musat.
9. 4th International Conference on Bioengineering and Polymer Science, 2-5 iunie 2025, Brașov, Romania, "Biocompatible microneedles patch for antiinflammatory transdermal drug delivery"- F.S. Iliescu.
10. 4th International Conference on Bioengineering and Polymer Science, 2-5 iunie 2025, Brașov, Romania, "Microbiome-Based Liquid Biopsy and Tumor-Associated Biomarkers in Colorectal Cancer: A Metagenomic and Functional Pathway Analysis" Gratiela Gradisteanu Pircalabioru.
11. 4th International Conference on Bioengineering and Polymer Science, 2-5 iunie 2025, Brașov, Romania „Points of view in bioengineering: molecular diagnostic, transdermal drug delivery and nanomedicine”,. C. Iliescu, (*plenary speaker*).
12. Institute Charles Sardon, CNRS, Universite de Strasbourg, 25 September 2025. "Microfluidics in Cell Culture and Gene Therapy" C. Iliescu, seminar invitat (Dr. Doru Constantin).
13. Technical University of Graz „Bioengineering research in eBio-hub” -6 Octombrie C. Iliescu, seminar invitat (prof. Charlotte Hausser).
14. International Semiconductor Conference (CAS 2025), 7–12 Octombrie 2025, Sinaia, Romania "Temperature behavior of the electrical conductivity of CNO-PVP nanocomposite films beyond the percolation threshold" – Cornel Cobianu.
15. International Semiconductor Conference (CAS 2025), 7–12 Octombrie 2025, Sinaia, Romania "Resistive Humidity Sensor Based on a Carbonaceous Ternary Nanocomposite as Sensing Layer" – Cornel Cobianu.
16. C. Iliescu, Bioengineering research in eBio-hub"-Brno University of Technology - seminar invitat.
17. BioRemed Conference, 16-18 October 2025, Oradea Romania "Microphysiological Systems for Drug Screening"- C. Iliescu (*plenary speaker*).

Lucrări științifice publicate în reviste ISI:

1. Tihăuan BM, Onisei T, Slootweg W, Gună D, Iliescu C, Chifiriuc MC. *Cannabidiol-A friend or a foe?*. European Journal of Pharmaceutical Sciences. 2025 Feb 8:107036, DOI: [org/10.1016/j.ejps.2025.107036](https://doi.org/10.1016/j.ejps.2025.107036);
2. Ghiță-Răileanu, M., Tihăuan, B.M., Lixandru-Petre, I.O., Gheorghiu, G.L., Pircalabioru, G.G., Cioca, G., Iliescu, F.S. and Iliescu, C., 2025. *Skin-on-chip: Quo vadis?*. APL bioengineering, 9(4), DOI: [10.1063/5.0268706](https://doi.org/10.1063/5.0268706), *articol cu impact in media: Scilight* (<https://lnkd.in/dVigScNJ>); *Cosmetic design* (<https://lnkd.in/deFwn94T>); *Federal Health Group* (<https://lnkd.in/dKUakP2Z>);
3. Roznovan, C. N., Măruțescu, L. G., & Gradisteanu Pircalabioru, G. (2025). *Immuno-Oncology at the Crossroads: Confronting Challenges in the Quest for Effective Cancer Therapies*. International Journal of Molecular Sciences, 26(13), 6177, DOI: [org/10.3390/ijms26136177](https://doi.org/10.3390/ijms26136177);
4. Tudorache, M., Treteanu, A. R., Gradisteanu Pircalabioru, G., Lixandru-Petre, I. O., Bolocan, A., & Andronic, O. (2025). *Gut Microbiome Alterations in Colorectal Cancer: Mechanisms, Therapeutic Strategies, and Precision Oncology Perspectives*. Cancers, 17(14), 2294. DOI: [org/10.3390/cancers17142294](https://doi.org/10.3390/cancers17142294);

Lucrări științifice publicate în reviste BDI:

1. E. Radu, L.E. Andrei, A-M Zamfirescu, G. Grădișteanu-Pîrcălăbioru, M. Ni, Y. Zhang, C. Iliescu, B.M. Tihăuan "Navigating challenges in drug testing and disease modelling: 3D skin Organoids versus 2D cell lines" Annals of the Academy of Romanian Scientists Series on Biological Sciences, vol 2 2025; DOI: [10.56082/annalsarscibio.2025.2.181](https://doi.org/10.56082/annalsarscibio.2025.2.181)

Aplicatie brevete nationale/internationale:

1. *Wideband plasmonic nanocomposites for light absorption , fabrication methods and applications* - Cornel Cobianu, Grațiana Grădișteanu, Laura Andrei, Florina Sivia Iliescu, Bianca Tihuan , Ciprian Iliescu, Horia Iovu – Aplicatie cerere brevet internațională (EPO) nr. inreg. 25465573.1./30.102025

A3.1 Dezvoltarea unor tehnologii de autoasamblare a nanoparticulelor pentru terapie genetică

Nanotehnologiile sunt pe cale să inducă schimbări profunde în societatea noastră și ar putea avea un impact extraordinar în diverse domenii, de la tehnologia informației la științele biomedicale. Cu toate acestea, nu au fost concepute încă strategii pentru valorificarea materialelor la nivel nanometric, mai precis, pentru a fabrica nanosisteme funcționale cu un randament ridicat care să răspundă unor cerințe specifice.

Procesele de auto-asamblare sunt considerate cea mai bună modalitate de fabricare a nanosistemelor cu structură tridimensională, cum ar fi cele implicate în științele biomedicale. Nanosistemele concepute pentru a administra medicamente sau gene active în celulele țintă, sau pentru a marca țesuturi specifice pentru bioimagnostică, sunt, fără îndoială, de mare importanță pentru diagnosticarea și tratamentul diverselor patologii și se vor traduce în beneficii economice substanțiale. Microfluidica începe să fie aplicată și în auto-asamblarea nanoparticulelor, lucrările științifice recente subliniind rolul pe care microfluidica îl poate juca, în special în controlul dimensiunii și omogenitatea nanoparticulelor obținute.

Există două abordări eficiente pentru compactarea ADN-ului: prima se bazează pe schimbul de solvent, iar a doua pe un proces de difuzie lentă. *Metoda prin schimb de solvent* presupune trecerea treptată a ADN-ului dintr-un mediu apoas în unul organic sau semiorganic, ceea ce favorizează condensarea sa.

În schimb, *metoda bazată pe difuzie lentă* utilizează introducerea controlată a unui agent de compactare, astfel încât acesta să pătrundă treptat în soluția de ADN, favorizând formarea structurii compacte. Pentru a evalua performanța metodei microfluidice în obținerea structurilor ADN compactate, au fost utilizate tehnici de caracterizare precum DLS (Dynamic Light Scattering), care permite măsurarea dimensiunilor particulelor formate în soluție, și TEM (Transmission Electron Microscopy), metodă ce oferă imagini detaliate la nivel nanometric ale structurilor obținute. Aceste analize au confirmat eficiența metodei în generarea complexelor pe bază de ADN cu stabilitate optimă.

3.1.1. Principiu de funcționare

O primă serie de experimente a fost efectuată pentru a testa fezabilitatea interacțiunii electrostatice dintre un surfactant cationic (DTAB - bromură de dodeciltrimetilamoniu) și un polielectrolit (CMC - carboximetilceluloză de sodiu) utilizând focalizarea hidrodinamică a fluxului. Surfactantul prezintă grupări cationice și un lanț alchil. Grupările cationice ale surfactantului interacționează electrostatic cu funcționalitățile încărcate negativ ai lanțului polielectrolitic, în timp ce interacțiunea hidrofobă dintre lanțurile alchil ale moleculei de surfactant induce compactarea lanțului polielectrolitic. Reacția este ilustrată în Fig. 1. Dimensiunea nanoparticulei rezultate este puternic influențată de concentrațiile și lungimea moleculelor de polielectrolit și surfactant, precum și de timpul de amestecare. În cazul amestecării în masă, dimensiunea nanoparticulelor formate este dificil de controlat, deoarece procesul este influențat de cinetica reacției.

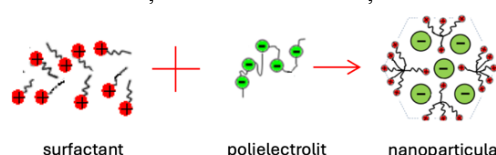


Figura 1. Reprezentare schematică a tranziției bobină-globul ca rezultat al interacțiunii dintre un surfactant (DTAB) și un polielectrolit (CMC).

Mecanismul de compactare a lanțului polielectrolitic poate fi mai bine controlat pe un cip microfluidic utilizând focalizarea hidrodinamică a fluxului, așa cum este ilustrat în Fig. 2. Fluxul de polielectrolit este focalizat între două fluxuri de surfactanți. Rezultatul este o distribuție uniformă a sarcinilor la interfață și un control mai bun al timpului de amestecare.

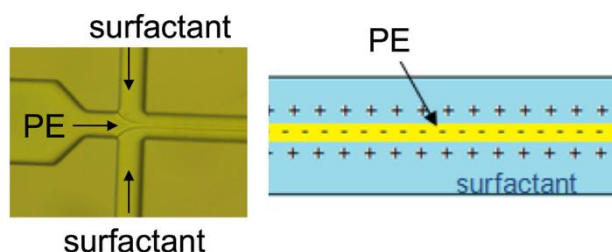


Figura 2. Imagine cu aria de focalizare a fluxului hidrodinamic a unui cip și ilustrarea interacțiunii electrostatice uniforme dintre fluxul polielectrolit și surfactant.

Curgerea în canalul microfluidic a fost simulată folosind pachetul FLUENT CFD (ANSYSR), considerând curgerea izotermă și laminară determinată de presiune în microcanalul fluidelor (newtoniene). Graficul din Fig. 3 prezintă variația lățimii de focalizare în funcție de raportul debitului pentru o debită stabilită a soluției de polielectroliti în curentul central.

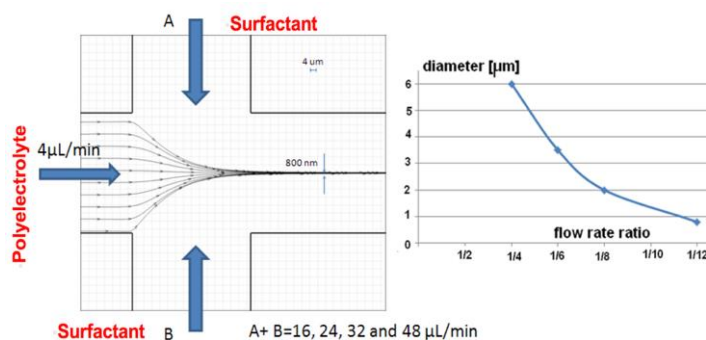


Figura 3. Imagine cu aria de focalizare a fluxului hidrodinamic a unui cip și ilustrarea interacțiunii electrostatice uniforme dintre fluxul polielectrolit și surfactant.

Rezultatele experimentale au arătat că atât raportul debitului, cât și concentrațiile de polielectrolit și surfactant au avut o influență puternică asupra dimensiunii finale a nanoparticulei, precum și asupra indicelui de polidispersie (PDI).

Un exemplu este prezentat în Fig. 4, unde variația diametrului hidrodinamic în funcție de raportul debitului a fost reprezentată grafic pentru diferite concentrații de surfactant (DTAB) și polielectrolit (CMC). Fig. 5 prezintă variația diametrului hidrodinamic în funcție de concentrația soluției de polielectrolit pentru două concentrații diferite de surfactant.

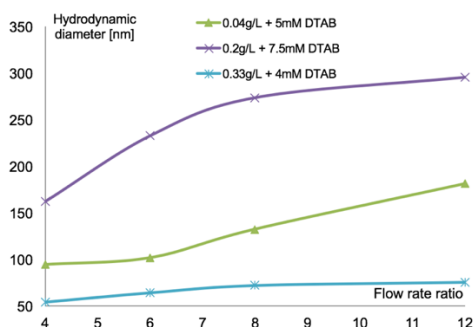


Figura 4. Variația dimensiunii particulelor în funcție de raportul debitului (surfactant/polielectrolit) pentru diferite concentrații

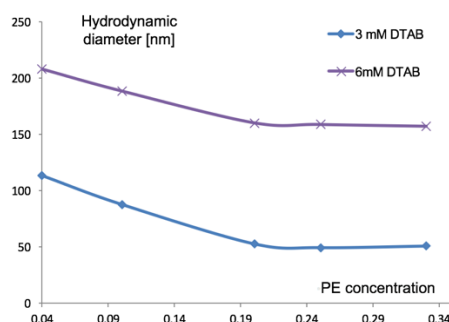


Figura 5. Variația dimensiunii particulelor în funcție de concentrația de polielectrolit pentru diferite concentrații de surfactant (raportul debitelor 12/1)

Se poate concluziona că focalizarea hidrodinamică a fluxurilor reprezintă o strategie eficientă pentru reglarea dimensiunii nanoparticulelor și pentru menținerea unei distribuții înguste a dimensiunilor, reflectată prin valori reduse ale PDI. Utilizând metoda descrisă anterior, a fost obținut un diametru

hidrodinamic minim de aproximativ 50 nm, în timp ce PDI-ul a rămas constant sub valoarea de 0,2, evidențiind o bună uniformitate a populației de particule.

O sinteză a influenței parametrilor operaționali este prezentată în TABELUL I. Analizând acești parametri, se observă că, în acest caz, cel mai puternic efect asupra caracteristicilor finale ale nanoparticulelor este exercitat de raportul dintre debitele utilizate.

Tabelul I: influența parametrilor asupra dimensiunii nanoparticulelor

Parametrul		Dimensiune NP
Raport debite (surfactant /polielectrolit)	↑	↑↑
Concentratie Polielectrolit	↑	↓
Concentratie surfactant	↑	↑

3.1.2. Limitări ale focalizării fluxului hidrodinamic

Metoda descrisă anterior a fost testată pentru compactarea ADN-ului, care a fost folosit ca polielectrolit. ADN-ul de timus al vițelului a fost introdus în flux prin canalul microfluidic central așa cum este ilustrat în Fig. 6. Rezultatele experimentale arată un indice mare de polidispersie (valori peste 0,5) și valori ale diametrului hidrodinamic mai mari de 200 nm (ceea ce face ca nanoparticula să fie mai puțin potrivită pentru aplicații în terapie genică). Rezultatele pot fi explicate prin diferența dintre densitatea liniară de sarcină a ADN-ului folosit și CMC (5,9 e/nm și respectiv 2,5 e/nm).

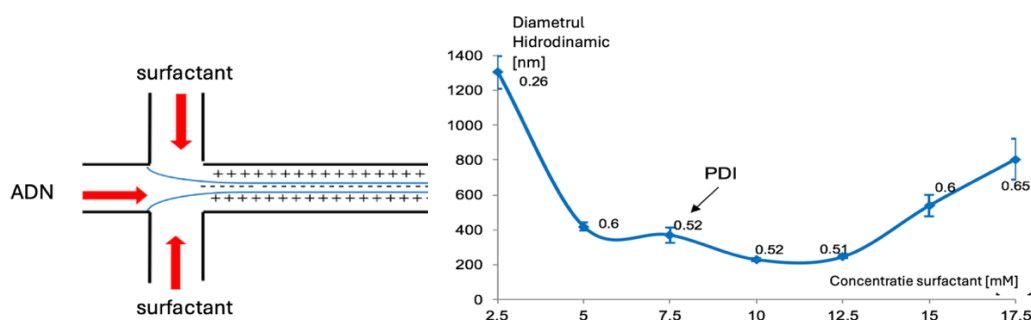


Figura 6. Metoda "standard" de focalizare hidrodinamică aplicată pentru compactarea ADN-ului (raport de debit surfactant /ADN 12/1)

3.1.3. Metoda "schimb de solvenți" folosind focalizarea hidrodinamică

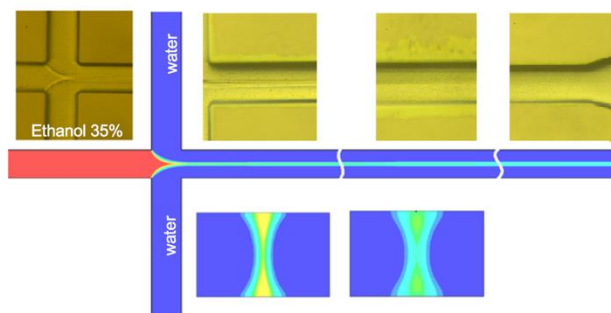


Figura 7. Metoda de schimb de solvenți: un jet central care conține ADN și surfactant în 35% etanol este fousat din lateral cu două jeturi de apă.

Metoda constă în separarea interacțiunii electrostatice (între grupa cationică a surfactantului și ADN) de interacțiunea hidrofobă dintre lanțurile alchile ale moleculelor de surfactant. În practică, compactarea se realizează în doi pași. Prima în bulk, amestecând ADN-ul și surfactantul în soluție de etanol 35%. A doua pe cip, concentrând soluția ADN-surfactant-etanol prin două jeturi de apă, diluând astfel concentrația de etanol și amplificând interacțiunea hidrofobă dintre lanțul alchil al moleculelor de surfactant. Metoda este ilustrată în Fig. 7, în timp ce în Fig. 8 este prezentată variația diametrului hidrodinamic cu concentrația surfactantului. Ca rezultat, s-au obținut nanoparticule de ADN-surfactant de 70 nm cu un PDI sub 0,2. Metoda are avantajul simplității, în timp ce parametrii de curgere au o influență redusă asupra dimensiunii particulelor. Mai mult, prezența urmelor de etanol în nanoparticulă, folosite pentru solubilizarea moleculelor de surfactant, poate limita aplicarea metodei în terapia genică.

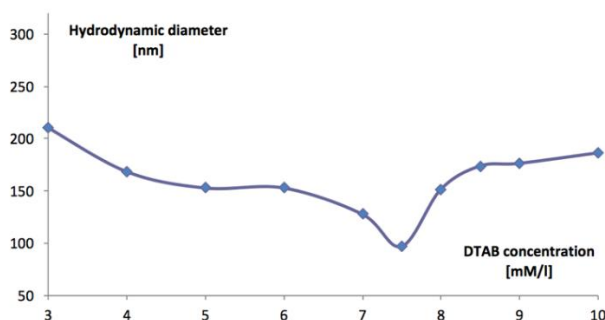


Figura 8. Variația diametrului hidrodinamic al nanoparticulei ADN-surfactant în funcție de concentrația surfactantului

3.1.4. Difuzie lentă printr-un jet tampon

Pentru a depăși dezavantajul metodei anterioare, proiectăm o "metodă fără solvenți organici". În această metodă, timpul de adsorbție al moleculei de surfactant la lanțul ADN a fost crescut drastic prin difuzia acestor molecule printr-un curent de apă. Structura dispozitivului microfluidic, precum și o imagine cu dispozitivul fabricat, sunt ilustrate în Fig. 9. Cipul oferă trei intrări pentru ADN, apă și DTAB. Fabricarea dispozitivului în tehnologie sticlă/siliciu a fost preferată, nu doar datorită robusteții dispozitivului, ci mai ales datorită posibilității de a reutiliza cipul după un proces scurt de curățare cu NMP. Principiul de funcționare este relativ simplu: un jet de apă DI este intercalat între un flux de ADN și altul de DTAB. ADN-ul și DTAB s-au difuzat treptat peste cursul de apă. Ca urmare, moleculele de surfactant interacționează una câte una în contact cu lanțurile de ADN. Tranziția DNA-DTAB bobină-globul a avut loc într-un regim diluat, condensând doar unul sau câteva lanțuri de ADN în aceeași nanoparticulă.

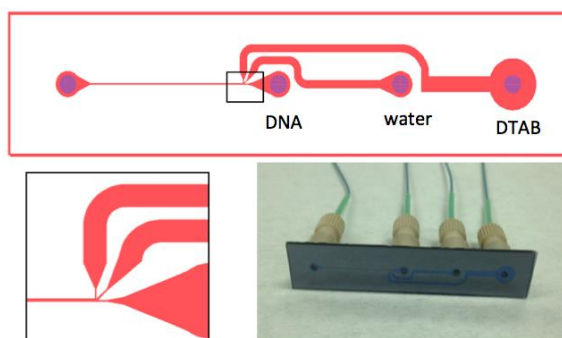


Figura 9. Configurația cipului microfluidic pentru difuzie lentă către curentul de apă și o imagine cu dispozitivul fabricat.

Rezultatele prezentate în Fig. 10 arată că se pot obține nanoparticule cu diametrul hidrodinamic de 30 nm. Acest lucru poate fi echivalent cu prezența unei molecule de ADN într-o nanoparticulă. Graficul ilustrat în Fig. 10 subliniază importanța jetului "tampon" în condensarea ADN-surfactant.

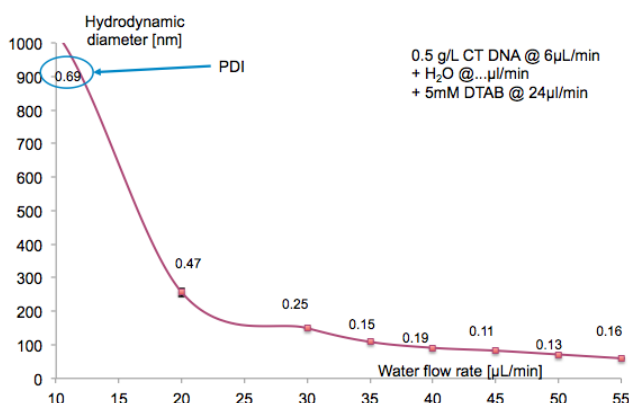


Figura 10. Variația diametrului hidrodinamic ca funcție a debitului cursului de apă

O micrografie TEM a nanoparticulelor obținute este prezentată în Fig. 11. Analiza imaginii relevă o distribuție omogenă a particulelor, acestea având o dimensiune relativ constantă și o morfologie bine definită. Uniformitatea populației de nanoparticule indică faptul că procesul de fabricație a fost controlat eficient, conducând la formarea unor structuri stabile și reproducibile.

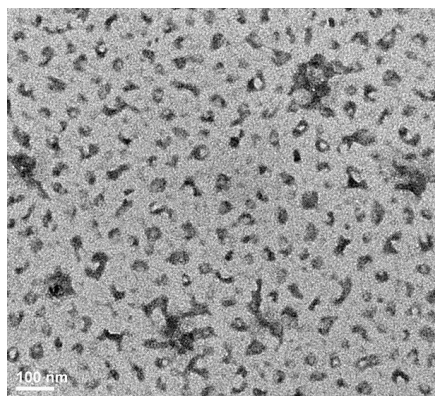


Figura 11. TEM image with DNA-DTAB nanoparticles.

Protocol pentru autoasamblarea nanoparticulelor pentru terapie genetică

1. Pregătirea cipului microfluidic (curățare cu alcool etilic și apă, acoperirea suprafețelor canalului cu PEG)
2. Setarea sistemului de procesare folosind pompe pentru microfluidică (Fig. 12)
3. Setarea parametrilor de curgere
4. Inițializarea curgerii (primii uL nu se vor colecta)
5. Colectarea cantității de nanoparticule
6. Evaluarea rezultatelor – diametrul hidrodinamic și PDI-folosind măsurători DLS
7. Curățarea cipului înlocuind lichidul de curgere cu alcool izopropilic (IPA)

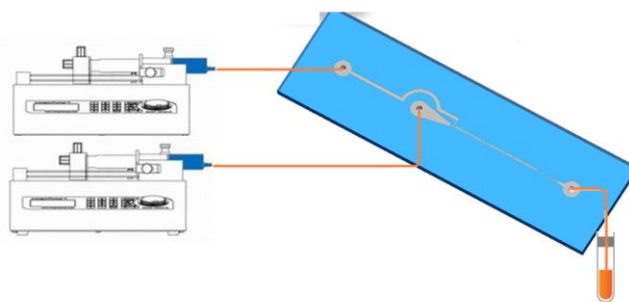


Figura 12. Schema sistemului de procesare a NP

3.2 Testarea in vitro a plastrilor personalizați cu microace folosind matrice generate prin printare 3D

Medicina și farmacia urmăresc un obiectiv comun, acela de a preveni, ameliora sau trata afecțiunile pacienților prin utilizarea unor strategii terapeutice capabile să livreze agenții activi către o țintă biologică specifică, la momentul adecvat, în concentrația optimă și într-un mod sigur, controlat și reproductibil. Diversitatea metodelor terapeutice și a formelor farmaceutice disponibile a permis dezvoltarea unor protocoale terapeutice personalizate, adaptate profilului clinic al pacienților.

Deși administrarea orală rămâne ruta preferată, aceasta este adesea inefficientă pentru compuși peptidici sau proteici, care prezintă stabilitate redusă în mediul gastrointestinal și biodisponibilitate limitată. Ca urmare, au fost dezvoltate căi alternative de administrare, cu scopul de a depăși aceste limitări și de a asigura o absorbție corespunzătoare a substanței active.

În acest context, administrarea transdermică s-a remarcat ca o opțiune viabilă, susținută de apariția unor tehnologii inovatoare, precum sistemele cu amplificatori mecanici – de exemplu, matricile de microace – sau combinații ale acestora cu alte abordări de intensificare a permeabilității cutanate. Aceste sisteme permit transportul eficient al medicamentului prin bariera tegumentară, îmbunătățind semnificativ nivelurile de absorbție.

Microacele reprezintă o categorie importantă de sisteme transdermice datorită proprietăților lor structurale avansate, care includ caracteristici mecanice optimizate, compatibilitate cu integrarea unor componente electronice funcționale, precum și posibilitatea unei producții la scară largă, în mod cost-eficient. O particularitate esențială a matricelor de microace este adaptabilitatea designului lor, care permite obținerea unor structuri cu invazivitate minimă, capabile să traverseze stratul cornos fără stimularea nociceptorilor, asigurând totodată eliberarea controlată sau programată a agentului terapeutic. Acest lucru susține utilizarea lor în terapii moderne, cu grad ridicat de siguranță și confort pentru pacient.

3.2.1. Testarea unor microace din polimer biocompatibil NOA63.

Microacele (MA) au fost fabricate prin tehnici de softlitografie, utilizând matrice realizate prin imprimare 3D. Structurile obținute au fost caracterizate din punct de vedere optic pentru a evalua geometria și integritatea morfologică a fiecărei ace. De asemenea, performanța funcțională a matricelor a fost investigată prin testarea capacității lor de inserție în specimene de piele porcină, demonstrând adecvarea lor pentru aplicații transdermice.

Caracterizare macroscopică. Fiecare placă a fost formată din matrice de 1cm² și 1mm fiecare. Fiecare matrice a fost formată dintr-o matrice de 9x9 Si MN-uri. Lungimea medie a MA - 400μm. (Fig. 13)

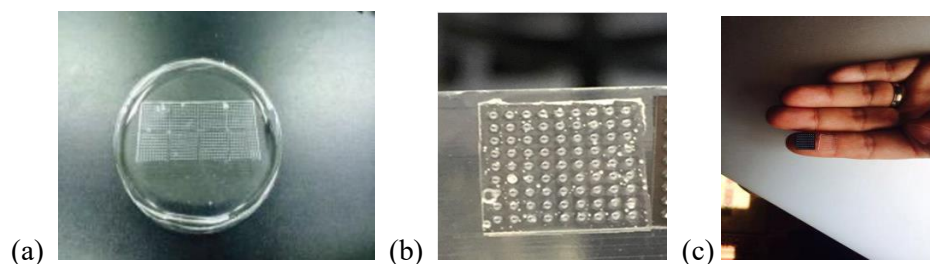


Figura 13. (a) Plăsture de microace format din mai multe matrițe. (b) o matrițe de MA (mărire 20x). (c) O singură matrițe de MA din NOA63.

Caracterizare microscopică. Microscopia SEM a fost utilizată pentru caracterizarea morfologică a microacelor fabricate din NOA63, în comparație cu cele realizate din siliciu.

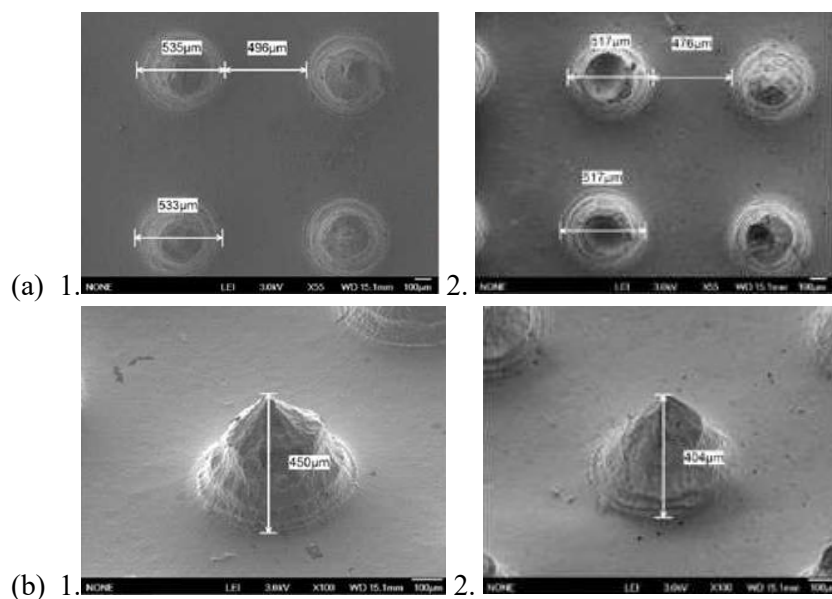


Figura 14. Imaginile SEM comparative ale MA pentru a evidenția geometria: (a) Geometria MA din Si. (b) geometria MA din NOA63.

Analiza funcțională microCT. Diferențele de densitate între materiale pot fi investigate prin imagistica cu raze X, care permite vizualizarea contrastului generat de variațiile de absorbție a radiației în funcție de densitatea și compoziția materialului. Această tehnică oferă informații valoroase despre structura internă, omogenitatea și eventualele defecte sau goluri, fiind utilă pentru evaluarea comparativă a diferitelor tipuri de materiale.

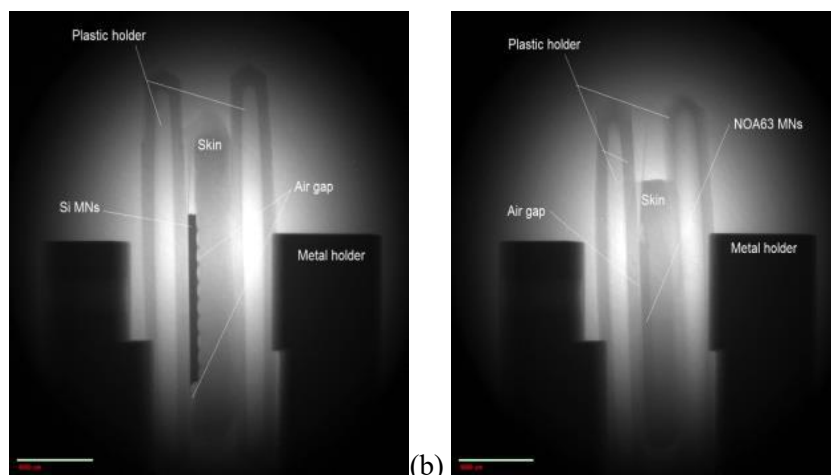


Figura 15. Testele de inserție comparate prin imagistică microCT: (a) MA din Si. (b) MA din NOA63

Testele de imagistică microCT au vizualizat capacitatea NOA63 MN de a pătrunde în stratul superficial al pielii (stratul cornos al epidermului) la diverse forțe de aplicare (4,5N, 10N, 13N, 22N). Zona din imaginea microCT cu un contrast mai redus (gri mai deschis) este datorită densității scăzute a materialului polimetric comparativ cu Si (absorbția scăzută a fotonilor de radiație raze X, la fel cu cel ce corespunde spațiilor de aer la interfața MA - piele și MA - suport din plastic). Zona cu contrast crescut (gri intens) este din cauza densității mai mari a materialului reprezentat de MA inserate în piele (Fig. 15).

Analiza ex vivo a inserției prin piele porcină.

Rezultatele testului de inserție au arătat densitățile microporilor creați de MA din NOA63. S-a observat că zona tratată cu MA avea margini bine definite și, de asemenea, rânduri de micropori cu o distribuție regulată. Acest model corespunde matricei MA și arată capacitatea MA de a penetra suprafața pielii. Modelele produse de MA aplicate pe piele s-au adăugat la aspectul natural al pielii. Totuși, zona adiacentă zonei de contact a MA nefiind tratată cu MA a prezentat o distribuție neregulată a microporilor corespunzător aspectului natural al pielii (Fig. 16). Astfel de rezultate au evidențiat precizia și robustețea MA din NOA63.

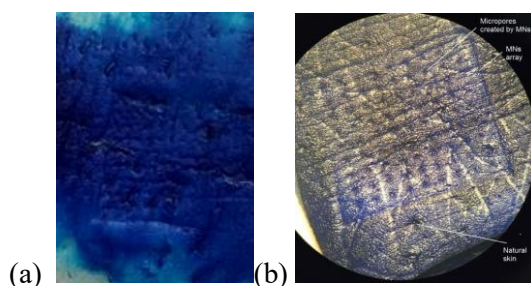


Figura 16. Punctele de intrare generate de microace (MA) în pielea porcină, colorată cu albastru de metilen: (a) aspect imediat după inserție, evidențiind pătrunderea colorantului; (b) după îndepărtarea excesului de colorant, imagine mărită de 8× utilizând un microscop de disecție.

Numărarea punctelor de intrare vizibile la suprafața probei de piele a arătat cum a avut loc inserția NOA63 MN la diverse forțe de inserție aplicate (aplicare manuală prin presiunea degetului mare 4,5N, 10N, 13N, 22N). Fig. 17 ilustrează corelația dintre forțele de inserție aplicate și capacitatea de penetrare a MA (densitatea microporilor creați).

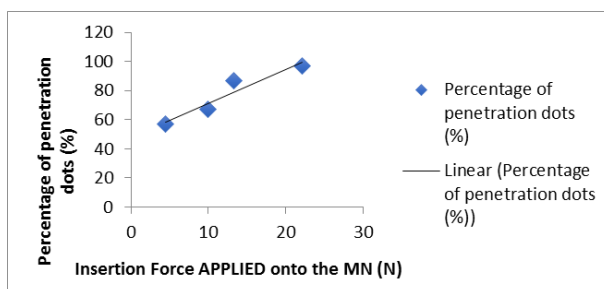


Figura 17. Corelația pozitivă ($r=0,94$) a indicat creșterea densității punctelor de intrare cu forța de inserție aplicată. 90% a fost atins cu forța 13N și inserție 100% la forță mai mare.

3.2.2. Testarea unor microace pe bază de PEGDA biocompatibil, obținute prin printare 3D.

Microacele printate au fost caracterizate optic atât din punct de vedere geometric, cât și funcțional, prin evaluarea capacității lor de inserție și a eficienței difuziei medicamentului, utilizând specimene de piele porcină *ex vivo*.

Analiza FTIR și NMR. Parametrii utilizați pentru printarea 3D și etapa de reticulare Uv au permis obținerea unei polimerizări complete a PEGDA, asigurând o rezoluție adecvată pentru scopul microacelor (MA). NMR contribuit la analiza chimică a compusului polimeric pentru evaluarea caracteristicilor mecanice necesare scopului MA (Fig.18).



Figura 18. Caracterizare structurală prin NMR a microacelor printate 3D pe bază de PEGDA

Caracterizare optică. Evaluarea macroscopică și prin microscopie optică a permis compararea rezultatelor obținute cu diferite formulări pentru printarea 3D. S-a observat că este necesar un echilibru între distribuția uniformă a vârfurilor microacelor pe matricea MA și proprietățile mecanice ale acesteia, pentru a asigura atât integritatea structurală, cât și funcționalitatea optimă a microacelor.

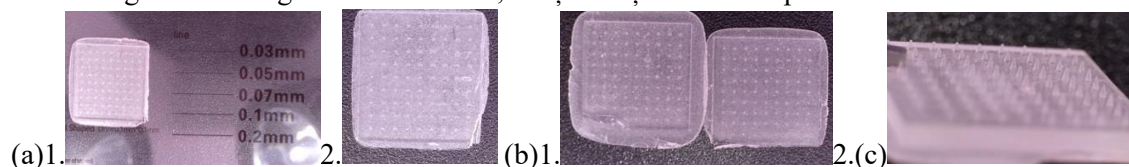


Figura 19. PEGDA MA: (a) MA obținute după 4 s timp de reticulare, putere 100, 80%; (b) MA la 6s timp de reticulare, putere 100, 80%. (c) Vârfurile MA printate (timp de întărire 6s, 100%)

Randamentul crescut al formării unor MA complete (Fig. 19, 20) confirmă eficiența parametrilor de printare aleși și metoda ca fiind eficientă economic.

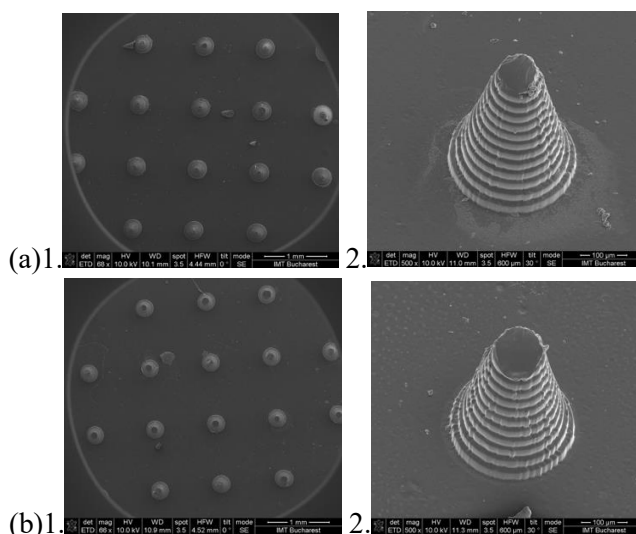


Figura 20. Evaluarea microscopică a MA: (a) SEM înainte de inserarea în modelul de piele porcină ex vivo. (b) SEM după inserarea în modelul de piele porcină ex vivo.

Rezultatele microscopiei SEM confirmă atât randamentul procedurii cât și îndeplinirea condițiilor pentru o inserție eficientă – vârful acului suficient de ascuțit, lungimea, densitatea acelor pe matrice și geometria optimă pentru o inserție eficientă la forță minimă.

Caracterizare mecanică. Aplicarea forțelor axiale a demonstrat comportamentul MA și capacitatea de a rezista compresiilor fără ruperea vârfului la forțele de aplicare necesare inserției cu succes în piele. Fig. 21 prezintă rezultatele testelor de compresie în piele porcină ex vivo pentru evaluarea punctelor de fractură.

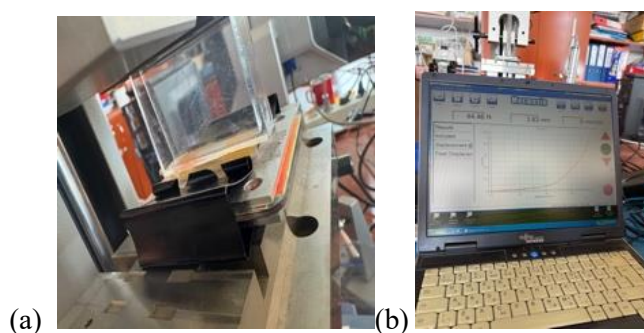


Figura 21. Testul de compresie: (a) sistemul creat pentru testarea matricei de MA. (b) forța aplicată și răspunsul MA.

Rezultatele indică rezistența la compresie (bariera de 45N) la forțe mult superioare celei de aplicare a MA pentru inserția în piele pentru livrare de substanțe transdermic (4.5N - 33N). Fig. 21 indică, de asemenea, rezistența vârfului MA la compresie, important pentru siguranța administrării.

Studiu de inserție cutanată in vitro. Inserția MA în pielea porcină ex vivo, așa cum se vede în Fig. 22 evidențiază capacitatea MA de a străpunge eficient pielea superficială la forțe aplicate corespunzător presiunii degetului mare din testele anterioare MA NOA63 (4,5N, 10N, 33N) .

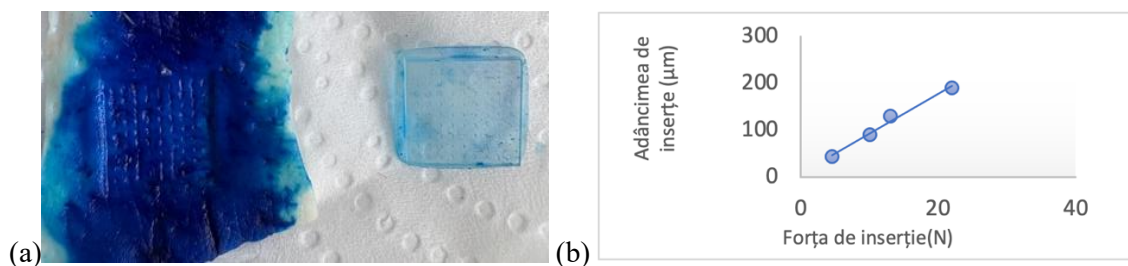


Figura 22. Inserția în pielea porcine ex vivo: (a) Punctele de intrare după testarea directă cu albastru de metilen. (b) Reprezentare grafică a eficienței inserției bazată pe cantitatea de forță folosită.

Rezultatele indică capacitatea de a crea microcanale prin pielea porcine folosită ca model de testare ex vivo. De asemenea, se prezintă și creșterea numărului de intrări corespunzătoare microcanalelor create cu forța aplicată. Acestea sunt necesare îmbunătățirii difuziei substanțelor active pentru a fi administrate eficient. Avantajos este nivelul forței aplicate care explică și caracterul MA de a fi un instrument ușor de aplicat de către utilizator.

Testul de permeație a substanțelor ce mimează un model de medicament. Un model de medicament a fost folosit pentru a mima procesul de transfer transdermic. Fig. 23 prezintă comparația profilurilor de difuzie ale modelului de medicament considerat, pentru două specimene de piele, cea netratată (control) și cea tratată cu MA. Este evidentă în Fig. 23b eliberarea medicamentului facilitată de noul plastru de MA.

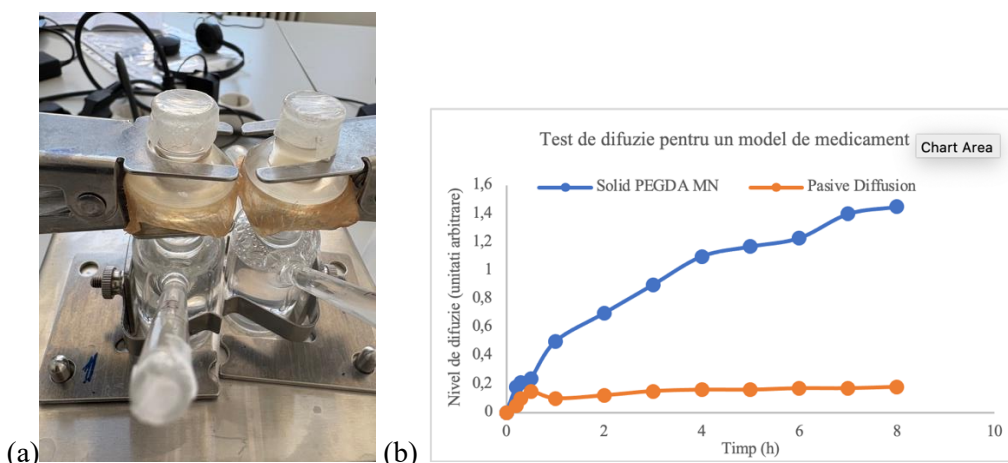


Figura 23. Profilurile de difuzie facilitate a unui model chimic. (a) sistemul de celule de permeație. (b) difuzia pasivă comparată cu difuzia facilitată pentru modelul chimic ce imită un medicament.

Concluzii. MA obținute la 6s timp de reticulare, putere 100% au fost luate în considerare pentru teste suplimentare, deoarece polimerizarea completă cu o rezoluție mai bună a fost observată. O cameră digitală a fost folosită pentru a număra MA în matrice, iar SEM a confirmat randamentul foarte bun de fabricație. MA au străpuns eficient stratul cornos, permițând în același timp aderența intimă la suprafața inegală a pielii și inserția în epiderma superficială pentru eliberarea modelului de medicament. Prin urmare, biocompatibilitatea materialelor îmbunătățește abilitățile unor metode noi ca terapeutice convenabile, sigure și autoadministrabile, pentru tratarea diferitelor afecțiuni medicale locale și sistemice. Metodele s-au dovedit simple, sigure, prietenoase cu utilizatorul și eficiente din punct de vedere al costurilor.

Protocol pentru testare in vitro a plasturilor personalizați cu microace

1. Sterilizare microace (UV/Autoclava)

2. Testare inserție mecanică în piele porcina sau membrana polimetrică la diverse forțe de apăsare
3. Testare penetrării uniforme folosind albastru de metil
4. Testare permeției medicament pe celula Franz cu evaluare prin HPLC

A3.3 Dezvoltarea unui tehnologii pentru printare 3D a modelului de piele folosind fibroblaste

Modelele de cultură celulară *in vitro* reprezintă instrumente esențiale pentru studiul comportamentului celular, screening-ul de medicamente și ingineria tisulară. Totuși, culturile bidimensionale (2D) tradiționale nu reproduc arhitectura tridimensională (3D) complexă, interacțiunile celulă-celulă și semnalele matricei extracelulare (ECM) din țesuturile vii, ducând la diferențe în fenotipul celular, proliferare și răspuns la stimuli. Pentru cercetări legate de piele, cum ar fi vindecarea rănilor, testarea medicamentelor dermatologice sau medicina regenerativă, modelele 3D cu sferoiduri formate din fibroblaste dermale umane și keratinocite epidermice oferă o platformă mai relevantă fiziologic, mimând structura stratificată a pielii.

Plăcile comerciale de atașare scăzută, precum Nunclon Sphera 96-well U-bottom, facilitează formarea sferoizilor prin suprafețe ultra-scăzute de atașare (ULA), dar adesea rezultă în dimensiuni variabile, celule periferice dispersate ("aură") și integrare suboptimală a ECM, în special pentru fibroblaste cu motilitate ridicată și aderență prin integrine. Pentru a depăși aceste limitări, am creat insertele din polidimetilsiloxan (PDMS) cu microwells au fost dezvoltate ca alternativă economică și adaptabilă. PDMS, un elastomer siliconic biocompatibil, permite fabricarea de microwells prin litografie (softlithography), confinând celulele pentru agregare uniformă a sferoizilor, păstrând proprietăți non-aderente când sunt netratate sau tratate cu plasmă.

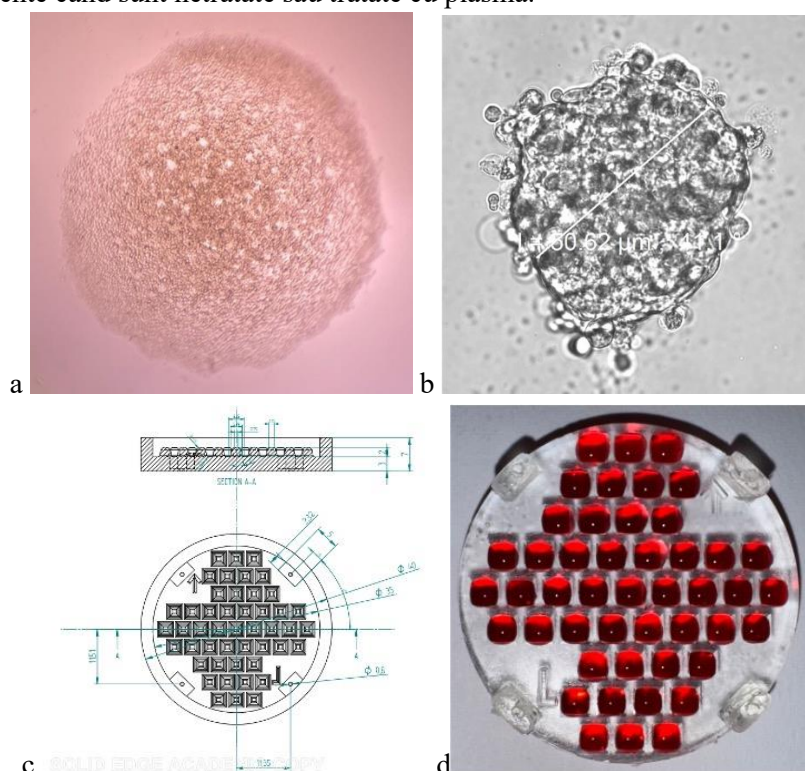


Figura 23. Motivația insertelor din polidimetilsiloxan (PDMS) cu microwells. (a) experimente preliminare în plăci Nunclon Sphera. (b) sferoizi agregați uniformi. (c) schematica insertele din polidimetilsiloxan (PDMS) cu microwells. (d) insertele printate din polidimetilsiloxan (PDMS) cu microwells

Motivația insertelor a provenit din experimente preliminare în plăci Nunclon Sphera (Fig. 23a), unde sferoizii de fibroblaste prezentau dimensiuni inconsistente (~100–500 μm) și dispersie periferică,

cu aspect de "aură" Prin integrarea de collagen în concentrație scăzută (0.1–0.5 mg/mL) ca mimetic al ECM, insertele vizează îmbunătățirea interacțiunilor celulă-matrice, stabilizarea nucleelor sferoizilor și minimizarea efectului "aură", permițând sferoizi agregați uniformi (Fig. 23 b).

Protocol:

Etapa 1: Proiectarea și fabricarea insertelor PDMS

Se creează matrița negativă (master mold) prin litografie moale sau prin imprimare 3D de înaltă rezoluție (microwells de 400–800 μm). Se toarnă PDMS (raport 10:1 bază:curing agent), se degazează și se întărește la 65°C timp de 2–4 ore. Insertele se decupează și se lipesc pe fundul plăcilor de cultură sau pe suporturi personalizate.

Etapa 2: Tratarea suprafeței și sterilizarea

Spălare cu etanol 70% și PBS, expunere UV 30 min sau autoclavare. Înainte de utilizare: incubare cu mediu de cultură sau BSA 1% pentru a menține caracterul non-aderent.

Etapa 3 : Însămânțarea și agregarea sferoizilor

Suspensie celulară (HDF $\pm$ HEK) + collagen I în concentrație foarte scăzută (0.1–0.3 mg/mL) pentru a reduce efectul „aură”. Se adaugă 150–250 μL /sferoid (2.000–10.000 celule/microwell). Centrifugare ușoară (200–300 g, 5 min) pentru a forța celulele în fundul microwell-ului $\rightarrow$ agregare rapidă și uniformă în 24–72 ore.

Etapa 4 : Menținerea și utilizarea sferoizilor

Sferoizii pot fi cultivați 7–21 zile, colectați ușor prin răsturnare sau cu pipetă cu vârf larg. Utilizare directă pentru teste de viabilitate, migrare, vindecare răni, co-cultură cu alte tipuri celulare sau încorporare în modele mai complexe (ex. modelul hibrid de piele).

Dezvoltarea și validarea unui model organotipic de piele cu grosime completă bazat pe hidrogel hibrid peptidă-collagen

Proiectul își propune crearea unui model de piele reconstruită tridimensional, cu strat dermal și epidermal complet diferențiat, utilizând un hidrogel hibrid format din peptide ultra-scurte auto-asamblante și collagen de tip I. Spre deosebire de modelele clasice bazate exclusiv pe collagen, care se contractă în timp și au proprietăți mecanice limitate, acest sistem hibrid combină avantajele celor două componente: gelificarea rapidă (sub 30 de minute) și arhitectura nanofibroasă a peptidelor cu bioactivitatea și motivele de adeziune celulară (RGD) ale collagenului. Rezultatul este un schelet stabil, cu pori tunabili între 10 și 200 nm, hidratare ridicată și viabilitate celulară superioară.

Metodologia urmează patru etape principale. În prima fază, fibroblastele dermice umane (HDF) și keratinocitele epidermice umane (HEK) sunt expandate în cultură, iar stratul acelular de bază (peptidă-collagen) este preparat. A doua etapă constă în turnarea stratului dermal: mai întâi un strat acelular de collagen pur ca bază solidă, apoi un strat celular în care fibroblastele sunt încorporate direct în matricea hibridă peptidă-collagen. După două ore de incubare, constructul dermal este stabil și gata pentru pasul următor. În etapa a treia, keratinocitele sunt însămânțate deasupra dermului și cultivate în mediu submersat până când formează o monocelulă confluentă și o joncțiune dermo-epidermică solidă. Ultima etapă implică ridicarea culturii la interfața aer-lichid (ALI), unde expunerea apicală la aer timp de 10–14 zile induce stratificarea completă a epidermei, de la stratul bazal până la cel cornos, cu formarea unei bariere funcționale similare pielii native.

Modelul obținut prezintă proprietăți superioare față de sistemele clasice. Gelificarea este rapidă, rigiditatea este mai mare și reglabilă, iar porii au dimensiuni nanometrice ideale pentru migrarea și remodelarea celulară. Viabilitatea celulară depășește 90% chiar și după două săptămâni la interfața aer-lichid, iar bariera epidermică atinge valori de rezistență transepithelială electrică (TEER) peste 500 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ și permeabilitate extrem de scăzută pentru markeri de 4 kDa, caracteristici comparabile cu pielea umană in vivo.

Datorită stabilității mecanice ridicate și reproducerii fidele a structurii și funcției pielii, acest model hibrid reprezintă o platformă ideală pentru testarea sistemelor avansate de eliberare transdermică și topică, inclusiv transethosome, microace biodegradabile și nanoparticule. În perspectivă, platforma va fi extinsă prin includerea melanocitelor și celulelor imune, precum și prin studii de permeație cu principii active reale, oferind astfel un instrument puternic pentru cercetarea preclinică în dermatologie și cosmetologie.

Protocol:

Etapa 1 : Prepararea materialelor și expansiunea celulară

- Expandare HDF (treceți 3–6) și HEK în mediu specific
- Prepararea soluției hibride: peptide ultra-scurte + collagen I rat tail (raport optim stabilit anterior)
- Prepararea stratului acelular de bază (colagen pur sau hibrid) în inserturi Transwell sau suporturi personalizate

Etapa 2 : Formarea constructului dermal

- Turnarea stratului acelular de bază (colagen pur) și gelificare 30–60 min la 37°C
- Prepararea și turnarea stratului celular: HDF ($0.5-1 \times 10^6$ celule/mL) încorporate în hidrogelul hibrid peptidă-colagen
- Incubare 2 ore la 37°C pentru contracție și atașare inițială → derm hibrid stabil

Etapa 3: Însămânțarea keratinocitelor și formarea epidermei inițiale

- Însămânțare $0.5-1 \times 10^6$ HEK/cm² pe suprafața dermului
- Cultură în mediu mixt 3–5 zile (raport 3:1 mediu keratinocite:fibroblaste + Ca²⁺ ridicat) până la confluență 100% și formarea joncțiunii dermo-epidermice

Etapa 4: Maturarea la interfața aer-lichid (ALI)

- Ridicarea insertului la interfața aer-lichid (doar mediu bazolateral, suprafața apicală expusă la aer)
- Cultură 10–14 zile cu schimb de mediu la 2 zile
- Inducerea stratificării complete (strat bazal → spinos → granulos → cornos) și formarea barierei funcționale (TEER >500 Ω·cm²)
- Model gata pentru teste de permeație, microace, iritanți, etc.

Întocmit,
Era Chair, CS1 Ciprian Iliescu



Director proiect,
Prof. dr. ing. Horia Iovu