Structuri poroase biomimetice obținute prin printare 3D pentru ingineria țesutului osos (Acronim: BIOGRAFTPRINT)

Etapa 2 – Designul compozițional și morfologic al materialelor utilizate ca substituenți de grefă osoasă. Răspunsul pe termen lung al osteoblastelor. Evaluarea răspunsului biologic *in vitro* al macrofagelor la materialele realizate. Demonstrarea și validarea tehnologiei de printare 3D și a produsului demonstrator

Act. 2.1 Finalizare – Caracterizarea morfo-structurală a materialelor printate 3D-UPB
Act. 2.2 Finalizare -Testarea stabilității morfo-structurale în SFB a structurilor printate 3D-UPB
Act. 2.3 Finalizare - Studii avansate asupra răspunsului osteoblastelor la materialele printate-UB
Act. 2.4 Evaluarea *in vitro* a răspunsului inflamator al macrofagelor la materialele printate-UB
Act. 2.5 Model experimental *in vivo* pentru capacitatea de oseointegrare a implantului printat 3D-UB
Act. 2.6 Elaborarea documentației tehnice pentru implanturile osoase printate 3D și pentru tehnologia de fabricație a acestuia UB/UPB
Act. 2.7 –Diseminare-Elaborare articol stiintific -Participare la manifestări științifice naționale și/sau internaționale UB/UPB
Act. 2.8 Diseminare

REZUMATUL ETAPEI 2 DE EXECUȚIE A PROIECTULUI

Studiile realizate în această etapă 2 a proiectului au avut ca scop caracterizarea morfo-structurală a materialelor printate 3D și stabilitatea lor în soluții care simulează fluidele biologice, evaluarea *in vitro* a răspunsul osteoblastelor și macrofagelor la suporturile printate 3D, manufacturarea implanturilor conform tehnologiei de printare stabilite, precum și realizarea studiilor *in vivo*.

Materialele compozite pe bază de COLL/HA/CS/ALG obținute prin printare 3D prezintă o structură poroasă, macroporii având dimensiune de 420x420µm, iar grosimea peretelui lor fiind de ~300µm. În funcție de acul utilizat pentu printare aceste dimensiuni pot varia considerabil.

Structurile poroase compozite au fost analizate prin microscopie FTIR în vederea evaluării comportamentului și stabilitatii lor în timp. Astfel, probele au fost analizate la lungimile de undă caracteristice colagenului și hidroxiapatitei. Benzile cele mai importante sunt cele de la 1240 și 1450 cm^{-1} iar menținerea acestor benzi la intensități similare este o dovadă a integrității structurii colagenice. Probele obținute, au fost, de asemenea evaluate din punct de vedere al stabilității

fizico-chimice, fiind menținute pentru 6 săptămâni în soluții care simulează fluidele biologice, uscate (prin liofilizare) și analizate din nou. Deoarece spectrul spectrul FTIR al materialului colagenic nu prezintă modificări, reiese faptul că degradarea probelor a fost minimală.

Studiile *in vitro* realizate de UB au arătat că suporturile printate analizate susțin capacitatea de adeziune, morfologia, viabilitatea, proliferarea și diferențierea osteoblastelor MC3T3-E1. Se observă o creștere a ratei de proliferare și a expresiei markerilor specifici diferențierii analizați (ALP, OPN) de la un timp de incubare la altul, efect observat pentru toate probele analizate, în proporții variate. Un alt obiectiv realizat a constat în investigarea efectului materialelor asupra activării macrofagelor și secreției de molecule pro-inflamatorii utilizând ca model experimental linia celulară de macrofage RAW 264.7. Astfel, s-a investigat, morfologia, viabilitatea, proliferarea celulară precum și expresia mediatorilor pro-inflamatori (TNF-α, IL-6) și a NO eliberați de către macrofage ca răspuns la contactul cu suporturile dezvoltate, atât în condiții standard de cultivare cât și în condiții inflamatorii (în prezență de lipopolizaharid).

Pentru studiile *in vivo* implanturile manufacturate conform tehnologiei de printare dezvoltate de către partenerul UPB din proiect au fost implantate la animale de laborator (șobolani Wistar). Astfel, inserarea implanturilor pe bază de COLL_HA; COLL_HA_Zn și COLL_HA_ALG, într-o fereastră creată la nivelul epifizei femurului, s-a realizat fără complicații, ca urmare a protocolului optim de anestezie și abord chirurgical. Monitorizarea clinică zilnică și radiografiile de control efectuate la 30 și 90 de zile post-implantare au evidențiat toleranța în țesut a structurilor poroase implantate. La 90 de zile, implanturile poroase COLL/HA/Zn și COLL/HA/ALG au fost degradate în totalitate de către organism, spre deosebire de implantul poros COLL/HA, din care încă se observă reziduuri în cantitate redusă. Nu au fost observate reacții de tip inflamator (fibrozare, corp străin, infecție). Țesutul osos și măduva hematopoietică și-au păstrat structura histologică normală. În urma examinării secțiunilor colorate Tricromic Masson, nu a fost decelat țesut fibros peri-implant. Analizele imunohistochimice au evidențiat prezența, macrofagelor rezidente, de dimensiuni mari, cu margini încreţite şi numeroase filopodii, caracteristici specifice macrofagelor activate de tip pro-inflamator (markerul CCR-7). Expresia crescută a markerului CD 163 specific unui proces anti-inflamator, se corelează cu o bună diferențiere și remodelare a țesutului osos la 3 luni de la implantare.