

Universitatea Națională de Știință și Tehnologie POLITEHNICA București

Facultatea de Inginerie Chimică și Biotehnologii

Departamentul de Știință și Inginerie a Materialelor Oxidice și Nanomateriale

Teză de doctorat

Coordonator științific:

Prof dr. ing. Anton FICAI

Doctorand:

Cosmin Iulian CODREA

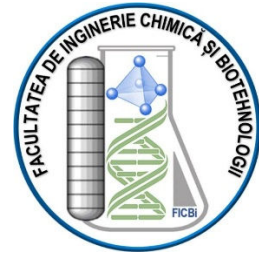
București

2024

Universitatea Națională de Știință și Tehnologie POLITEHNICA București

Facultatea de Inginerie Chimică și Biotehnologii

Departamentul de Știință și Inginerie a Materialelor Oxidice și Nanomateriale



FABRICAREA DE IMPLANTURI IMPRIMATE 3D PE BAZĂ DE HIDROXIAPATITĂ CU STRONȚIU
ÎN COMBINAȚIE CU POL(E-CAPROLACTONĂ) ȘI GELATINĂ METACRILICĂ PENTRU
APLICAȚII DE REGENERARE OSOASĂ

Coordonator științific:

Prof dr. ing. Anton FICAI

Doctorand:

Cosmin Iulian CODREA

București

2024

Conținut

Prescurtări	4
Introducere	6
Prima parte: Studiul critic al datelor din literatură	9
Capitolul 1: Materiale compozite cu conținut de Sr utilizate pentru substituenți printați 3D	9
Capitolul 2: Printarea 3D	12
Capitolul 3. Articol de recenzie <i>in extenso</i>	14
Capitolul 4. Scopul tezei și originalitatea	15
Partea a doua: Contribuții originale	17
Capitolul 5: Materiale și metode	17
Capitolul 6: Articole originale <i>in extenso</i>	20
Capitolul 7: Concluzii generale și perspective	39
Capitolul 8: Lista publicațiilor și participărilor la conferințe naționale	42
Bibliografie	43

Prescurtări

CPC – Cimenturi de fosfat de calciu

HA – Hidroxiapatită

Sr – Stronțiu

SrHA – nanohidroxiapatită cu conținut de stronțiu

HT – Hidrotermal

PR – Precipitare

PLA – Acid polilactic

PGA – Acid polilglicolic

PLGA – Acid polilactic-co-glicolic

PCL – Policaprolactonă

TCP – Fosfat tricalcic

FDM – Modelare prin Extrudare Termoplastică

DPE – Extrudare directă din pelete (granule).

DIW – Imprimare directă cu jet de cerneală

SLA – Stereolitografie

SLS – Sinterizarea selectivă cu laser

DLP – Procesare digitală a luminii

EBM – Topire prin fascicul de electroni

DCM – Diclorometan

XRD – Difracția cu raze X pe pulbere

FTIR – Spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier

BET – Brunauer-Emmett-Teller

TEM – Microscopie electronică cu transmisie

SAED – Difracția electronilor în zonă selectată

EELS – Spectroscopie de pierdere a energiei electronice

SEM – Microscopie electronică de scanare

TGA – Analiza termogravimetrică

SBF – Fluid corporal simulat

PBS – Soluție salină tamponată cu fosfat

RMN – Spectroscopie de rezonanță magnetică nucleară

CAD – Proiectare asistată de calculator

FDA – Administrația SUA pentru Alimente și Medicamente

BMSC – Celule stem mezenchimale ale măduvei osoase

hMSC – Celule stromale mezenchimale

Cuvinte cheie: policaprolactonă, imprimare 3D, nano-pulbere de hidroxiapatită; stronțiu, co-precipitare; hidrotermal; bioactivitate.

Introducere

Mecanismele care cauzează încetinirea vindecării sunt diverse și includ răspunsuri imune excesive și condiții mecanice suprasolicitante, ambele perturbând reglarea delicată necesară pentru etapele incipiente ale vindecării¹. Soluțiile de reparare a oaselor rămân o direcție promițătoare a cercetării datorită cererii în continuă creștere și disponibilității limitate a înlocuitorilor de oase..

Osteoporoza este o afecțiune cronică și debilitantă marcată de o scădere a calității masei osoase, ceea ce îi face pe vârstnici mai predispuși la fracturi osteoporotice, cunoscute și sub denumirea de fracturi de fragilitate, rezultate chiar și în urma unor traumatisme cu energie scăzută². Persoanele diagnosticate cu osteoporoză se confruntă cu o scădere a densității minerale osoase, ceea ce crește riscul de fracturi³ și deformări debilitante ale coloanei vertebrale⁴.

Tratamentele actuale se bazează în principal pe grefele osoase clasice, și anume autogrefele, precum și pe alogrefe și xenogrefe. Chiar și așa, aplicarea clinică a acestor înlocuitori este împiedicată de neajunsuri, cum ar fi o aprovizionare limitată de donatori, necesitatea unor intervenții chirurgicale suplimentare și riscurile de propagare a bolilor și răspunsul imun după implantare^{5,6}, precum și leziuni neurovasculare, hematom și formarea seromului⁷. În cazul autogrefelor, durerea la nivelul locului donator împreună cu un timp operațional crescut sunt dezavantaje neplăcute^{7,8}.

Substituenții din biomateriale pot fi folosite ca implanturi, dar trebuie să se conformeze caracteristicilor osului autentic, cum ar fi osteoinductivitate, osteoconductivitate, biocompatibilitate și rezistență mecanică⁵. Există multe încercări de a construi noi substituenți care să poată înlocui grefele folosite în acest moment în practica clinică. Cercetările s-au concentrat pe materiale și tehnici care reproduc trăsăturile dorite și evit mai multe probleme critice, inclusiv cheltuielile mari, riscul ca factorii de creștere să provoace tumori și dificultatea de a realiza o integrare naturală cu țesutul normal adiacent, care poate provoca inflamații, afânare și osteoliză și, ulterior, fracturi de implant⁵. În ciuda rezultatelor clinice încurajatoare în urma implantării substituenților, problemele privind

topografia, sursa și cantitatea celulelor, dozarea factorului de creștere și metoda de livrare, precum și mecanismele precise de acțiune ale acestora, rămân nerezolvate⁹.

Multe biomateriale pe bază de Sr examinate au demonstrat o îmbunătățire a osului nou la locul de implantare și au prezentat o tendință de a accelera vindecarea atunci când se face o paralelă cu omologii fără Sr¹⁰⁻¹². Această îmbunătățire este așteptată pentru a promova vindecarea osoasă *in vivo*, datorită atributelor anabolice și anticatabolice recunoscute pe care le are Sr. Rețeaua HA poate încorpora substituenți ionici diferiți menținând în același timp structura cristalină. HA este o componentă esențială a osului autentic și ar trebui inclusă în implanturile concepute pentru a reproduce osul pacientului pentru aplicații ortopedice¹³. Datorită caracteristicilor lor fragile și de non-printabilitate, acest tip de ceramică ar trebui să fie integrat cu polimeri pentru a fi utilizați la imprimarea aplicațiilor de implanturi de țesut osos. Substituenții cu SrHA au arătat niveluri ridicate de mineralizare în comparație cu substituenții PCL și PCL/HA în evaluările *in vitro*, sugerând potențialul lor pentru aplicații în ingineria țesutului osos¹⁴. Concentrația cea mai favorabilă de Sr²⁺ în compozite acestora este încă controversată¹⁵, iar alegerea dozei adecvate de Sr²⁺ necesară pentru a promova regenerarea osoasă este o problemă pe care lucrarea de față o abordează.

În domeniul biomedical, polimerii termoplastici sintetici au câștigat o acceptare pe scară largă. PCL se evidențiază ca un poliester alifatic termoplastic utilizat pe scară largă în ingineria țesuturilor datorită biocompatibilității și biodegradabilității sale laudabile¹⁰. Natura semicristalină a PCL, atribuită structurii sale ordonate, îi conferă o rată lentă de degradare, făcându-l potrivit pentru aplicații prelungite^{16,17}. În plus, ușurința de prelucrare a termoplasticelelor permite crearea de substituenți cu proprietăți mecanice reglabile. Caracteristicile optime de degradare ale substituenților și creșterea bioactivității sunt cel mai eficient obținute prin integrarea aditivilor ceramici precum HA, care, de asemenea, stimulează potențialul de formare osoasă *in vivo*¹⁸.

Hidrogelurile au devenit, de asemenea, biomateriale promițătoare pentru ingineria țesuturilor și studiile de regenerare osoasă. Atractivitatea lor constă în asemănarea lor structurală și compozițională cu matricea extracelulară, conținut ridicat de apă și

biocompatibilitate adecvată. În plus, hidrogelurile permit personalizarea proprietăților lor biofizice și biochimice. Anumite hidrogeluri oferă, de asemenea, beneficii suplimentare, cum ar fi costuri reduse de producție, multifuncționalitate, regenerabilitate, biodegradabilitate și compatibilitate excepțională cu sistemele biologice¹⁹.

Imprimarea 3D are o versatilitate mare și poate produce implanturi specifice pentru numeroase aplicații de mărire osoasă. Designul substituenților poate fi adaptat pentru a se potrivi cu diferite porozități, geometrii și topografii ale suprafeței, pentru a semăna cu osul natural și pentru a răspunde cerințelor fiecărui defect specific²⁰. Studiul nostru a folosit o gamă largă de concentrații de Sr în probele de HA sintetizate și două dintre cele mai utilizate metode de sinteză pentru a avea o viziune extinsă asupra problemei și a contribui la baza viitoarelor practici standard în domeniu. Am decis să folosim două tehnici de imprimare 3D populare, dar foarte apreciate, cu rezultate promițătoare în domeniul cercetării implanturilor osoase, pentru a contribui la stabilirea lor ca soluții de încredere.

În această teză, scopul nostru a fost să proiectăm și să obținem noi substituenți din compozite imprimate 3D, cu aplicații biomedicale în tratarea osului afectat de osteoporoză, pe baza SrHA ca purtător pentru ionii Sr antiosteoporoză. Prima direcție studiată folosește PCL ca bază structurală, iar a doua GelMA. Motivația pentru obiectiv se bazează pe capacitatea ionilor Sr de a crește proliferarea osteoblastelor și de a diminua activitatea osteoclastelor. Am folosit materiale compozite care combină avantajele fiecărei componente într-un material superior. Imprimarea 3D a fost folosită pe baza capacităților acesteia de a personaliza implanturile într-un mod superior celorlalte metode.

Această teză este compusă din două părți principale: Partea întâi: Studiu critic al literaturii științifice, care conține un rezumat cuprinzător și o analiză a cercetărilor existente (Capitolele 1 și 2), împreună cu un articol de recenzie publicat pe acest subiect (Capitolul 3), ca precum și obiectivele tezei și originalitatea (Capitolul 4), și Partea a doua: Contribuții originale, care conțin o prezentare a metodelor și conceptelor utilizate în articolele publicate prezentate în teză (Capitolul 5), împreună cu cele trei articole de cercetare originale publicate (Capitolul 6), precum și concluziile și perspectivele generale (Capitolul 7) și o listă de publicații și participări la conferințe naționale (Capitolul 8).

Prima parte: Studiul critic al datelor din literatură

Capitolul 1: Materiale compozite cu conținut de Sr utilizate pentru substituenți printați 3D

Compozitele polimer/HA sunt în prezent în curs de investigare, inclusiv o varietate de polimeri sintetici și naturali. Unele produse compozite gelatină/HA au fost dezvoltate și puse la dispoziție pentru piață sub formă de substituenți poroși, fibre și hidrogeluri. Recenziile recente ale literaturii au indicat că combinarea polimerilor sintetici cu materiale ceramice poate atenua eficient limitările fiecărei componente individuale²¹. Principalele scopuri ale fabricării substituenților pe bază de polimeri care conțin bioceramică bioactivă sunt de a face implanturi osteoconductive și de a le crește rezistența²².

PCL este utilizat pe scară largă ca biomaterial datorită toxicității sale minime și imprimabilității excelente în timp ce deține și aprobarea FDA²³⁻²⁵. Cu toate acestea, pentru a aborda limitările sale inerente, cum ar fi hidrofobicitatea, interacțiunile biologice scăzute și locurile limitate de adeziune celulară, au fost dezvoltate mai multe biomateriale compozite pe bază de PCL²⁶. PCL are temperatura de tranziție sticloasă aproape de -60 °C, în timp ce temperatura de topire variază între 59-64 °C²⁷, caracteristici care sunt considerate benefice pentru imprimarea 3D²². PCL are un model de degradare relativ constant datorită greutatei sale moleculare ridicate și ratei de difuzie lente, o consecință a hidrofobicității inerente²⁸. PCL, deși biodegradabil, este cunoscut că are o rată scăzută de degradare în condiții fiziologice^{24,29}, unii autori menționând doi până la patru ani *in vivo* în cazul implanturilor mai mari de 1 cm cub¹⁸.

HA a fost încorporat cu succes în substituenții din compozite PCL/HA imprimate 3D până la 30% fără a modifica semnificativ morfologia sau compoziția chimică a substituenților. Adăugarea de HA în PCL a îmbunătățit progresiv rezistența mecanică, proliferarea celulară și mineralizarea²⁶. Compoziția substituenților de 70% (greutate) PCL - 30% (greutate) HA a fost indicată a fi de dorit prin rezultate mai bune raportate în mod constant comparativ cu substituenții cu conținut mai scăzut de HA în ceea ce privește degradabilitatea și biocompatibilitatea^{14,24,30,31}, în timp ce un conținut mai mare de HA este

complicat de obținut prin extrudare din cauza limitărilor metodei atunci când vâscozitatea materialului este crescută³¹.

Studiile anterioare *in vitro* și *in vivo* privind activitatea biologică a SrHA încorporată în implanturi ca acoperiri pe structuri de Ti, membrane, geluri sau tablete, au demonstrat efectul osteogenic al SrHA în relație cu viabilitatea, proliferarea și morfologia celulelor^{11,12}. Se consideră că Sr^{2+} promovează regenerarea osoasă prin inducerea polarizării macrofagelor¹⁵. Descoperirile sugerează că substituenții PCL/SrHA pot fi construiți cu ușurință folosind tehnici de imprimare 3D și sunt foarte promițători ca materiale implantabile pentru aplicațiile de regenerare osoasă^{16,32}. Substituenți PCL/SrHA au fost obținuți prin electrofilare și studiile au confirmat că includerea microparticulelor SrHA a crescut rata de degradare *in vitro* a PCL¹⁶. De asemenea, astfel de fibre compozite pot contribui ca sursă de Sr și Ca cu o eliberare susținută de mai mult de 28 de zile³³. Studiile de bioactivitate *in vitro* au arătat rate de dizolvare îmbunătățite și creștere intensă a stratului de apatită pe suprafața materialelor SrHA atunci când sunt scufundate în SBF, iar studiile de adsorbție a proteinelor cu ser fetal bovin au arătat o afinitate mai mare față de materialele SrHA în comparație cu HA pur³⁴. Alți autori au pregătit substituenți imprimați 3D din PCL și SrHA pentru a imita componentele organice/anorganice ale țesutului osos natural³². Unii autori menționează că biodegradarea unui material implantat depinde mai mult de resorbția pasivă legată de viteza de dizolvare a compozitului în fluidele corporale decât de resorbția activă datorată activității macrofagelor și osteoclastelor sau fagocitozei³⁵. Încorporarea SrHA a permis eliberarea ionilor de Sr bioactivi și a îmbunătățit rezistența la compresiune a schelei³⁶. Microporozitatea datorată încorporării unei componente ceramice în compozit poate avea ca rezultat o suprafață extinsă în contact direct cu fluidele corporale, grăbind astfel biodegradarea și promovând depunerea de apatită pe suprafața materialului, care la rândul său sporește bioactivitatea materialului³⁷.

Literatura de specialitate evidențiază diverse aplicații ale hidrogelurilor, inclusiv vindecarea rănilor³⁸, grefe vasculare și inginerie cardiovasculară³⁹, demonstrând versatilitatea acestora în contexte biomedicale. GelMA este un material sintetizat din reacția gelatinei, care este derivată din colagen, și anhidridă metacrilică și a fost, de

asemenea, utilizat pentru o varietate de aplicații. Grupările metacrilat sau metacrilamidă sunt grefate pe grupările hidroxil și amină primară prezente de-a lungul scheletului de gelatină, facilitate de aceasta din urmă. Aceste grupări funcționale permit polimerizarea radicalică atunci când sunt expuse la iradiere UV sau lumină vizibilă și cantități mici de fotoinițiator (cum ar fi fenil-2,4,6-trimetilbenzoilfosfinat de litiu). Acest proces duce la formarea unui hidrogel rezistent, chiar și la temperaturi fiziologice, cu legături covalente în interiorul și între lanțurile polimerice⁴⁰.

Hidrogelurile GelMA au primit o atenție din ce în ce mai mare în ingineria țesuturilor datorită combinării bioactivității gelatinei cu ajustabilitatea hidrogelurilor foto-reticulabile. Proprietățile hidrogelurilor, cum ar fi rigiditatea, rata de degradare și bioactivitatea, pot fi controlate prin modificarea gradului de substituție a metacrilatului, concentrația macromerului și condițiile de reticulare.

Hidrogelurile GelMA au fost utilizate recent în creșterea oaselor și cartilajului datorită biocompatibilității lor excelente (inclusiv biosecuritate și funcționalitate biologică), aderenței celulare și caracteristicilor fizico-chimice ajustabile. Porii largi din rețeaua de hidrogel GelMA permit eliberarea direcționată a substanțelor funcționale prin încorporarea acestora în matricea GelMA⁴¹. În plus, încorporarea bioceramelor în GelMA poate îmbunătăți caracteristicile sale, cum ar fi rezistența, aderența celulară, proliferarea, osteoconductivitate și depunerea matricei extracelulare, care sunt esențiale pentru repararea eficientă a osului⁴². Aceste compozite pot fi proiectate pentru a prezenta proprietăți mecanice adaptate, sensibilitate la temperatură și stimuli magnetici, conductivitate, porozitate controlabilă, umflare și degradabilitate, bioactivitate, extinzându-și aplicațiile potențiale⁴³.

O provocare în dezvoltarea implantului este adaptarea ratei de degradare a compozitului pentru a se alinia cu creșterea țesuturilor, până la niveluri specifice pacientului. Studiile anterioare au identificat mai multe limitări ale hidrogelurilor sintetice convenționale, inclusiv structurile de rețea izotrope, rezistența mecanică inadecvată, aderența slabă la țesuturi și lipsa osteoconductivității. Majoritatea hidrogelurilor acționează doar ca suport, mai degrabă decât să promoveze în mod activ regenerarea

osoasă¹⁹. Prin urmare, dezvoltarea hidrogelurilor multifuncționale și a compozitelor acestora a apărut ca un domeniu de cercetare intrigant ce vrea să depășească aceste provocări.

Capitolul 2: Printarea 3D

Printarea 3D presupune construirea de implanturi personalizate prin depunerea precisă a materialelor strat cu strat conform unui șablon predefinit⁴⁴. Este un grup de tehnologii care oferă beneficii, cum ar fi implicare umană minimă, asamblare mai rapidă, cicluri de proiectare scurtate și configurarea simplificată a echipamentelor⁴⁵, ele sunt și eficiente în ce privește costurile și foarte reproductibile⁴⁶. Această abordare arată un potențial semnificativ de sustenabilitate prin scăderea deșeurilor de materiale, a etapelor ciclului de dezvoltare a produsului și, în general, a costurilor de producție asociate⁴⁷.

În ceea ce privește fabricarea substituenților, sunt disponibile numeroase metode, atât convenționale (de exemplu, separarea fazelor, spumarea gazului, turnarea cu solvenți), cât și grupul mai inovator al imprimării 3D (de exemplu, FDM, SLA, SLS, DLP, EBM)⁴⁸. Imprimarea 3D permite fabricarea de substituenți 3D cu arhitectură precisă, utilizând datele procesate de software-ul CAD. Aceste metode sunt capabile să creeze geometrii complexe prin depunerea de straturi alternative, conform construcției inițiale dintr-un fișier .STL și cu ajutorul software-ului imprimantei. Modelul digital este împărțit în straturi sau felii, construind treptat o construcție 3D din straturi 2D care se leagă între ele⁴⁹. Imprimarea 3D permite fabricarea de structuri poroase în gradient cu o multitudine de modele datorită personalizării caracteristicilor porilor⁴². FDM și DLP, despre care se consideră că au îmbunătățit considerabil calitatea produselor biomedicale⁴⁶, sunt detaliate mai jos.

FDM este o tehnică bazată pe extrudare care utilizează polimeri termoplastici și este cea mai utilizată din acest grup de tehnici⁵⁰. Filamentele sunt găzduite în rolă și direct legate de capul de extrudare. Elementul de încălzire din capul de extrudare este utilizat pentru a trece filamentul într-o formă lichidă vâscoasă înainte de a-l extruda prin duză pe zona de imprimare pentru a crea elementul final. Filamentul solid care intră funcționează

ca un piston, împingând și extrădând materia primă topită prin duză^{51,52}. O notă importantă este că FDM este în mare parte aceeași metodă ca FFF și denumirile pot fi utilizate interschimbabil^{53,54}. Alte modele de extrudare, cum ar fi imprimantele tip șurub sau seringă, se încadrează, de asemenea, în familia FDM⁵². O variantă a FDM este DPE, care utilizează pelete DPE de materiale pentru extrudare. DPE este o tehnică de extrudare a materialului care utilizează polimeri termoplastici, care este mai simplă și mai economică. Imprimarea DPE elimină anumite etape intermediare, făcând procesul mai ieftin și mai versatil⁵⁵. Această clasă de extrudare funcționează prin topirea materialului găsit în interiorul unui recipient mic și folosind un piston pentru a-l forța afară într-un ritm controlat⁵². Alți autori menționează aceeași tehnică ca DIW sau bioplotting. Imprimarea DIW sau prin presiune, folosește un sistem de distribuție pneumatic sau mecanic (cu ajutorul unui piston sau șurub) pentru a extruda materialele topite, soluțiile, gelurile sau suspensiile printr-o duză sau seringă. DIW este citată a fi cea mai răspândită tehnică pentru bioprintarea suspensiilor celulare, hidrogelurilor încărcate cu celule și soluțiilor bazate pe matrice extracelulară⁵⁶.

Imprimarea DLP presupune reticulare pas cu pas a materialelor fotosensibile. DLP implică legarea fotochimică a monomerilor mici într-un mod asemănător lanțului pentru a crea un obiect solid⁴⁸. DLP oferă avantaje precum viteza crescută, manipularea simplă a proprietăților mecanice și rezoluția scalabilă până la 1 μm , depășind alte tehnici⁵⁷. DLP abordează obstacolele existente în fabricarea rapidă a blocurilor de țesut cu mare precizie, permițând producerea de substituenți într-un ritm semnificativ clinic. Viteza de imprimare a DLP o depășește pe cea a imprimării 3D prin extrudare⁵⁷. Cu imprimarea DLP, un proiector digital de lumină redă rapid imagini complicate cu forma 3D dorită. DLP și SLA bazate pe lumină sunt deja adoptate în domeniul stomatologiei, unde scanere 3D și imprimante 3D sunt folosite pentru a crea coroane, implanturi chirurgicale, protecții și dispozitive de fixare specifice pacientului⁵⁸.

În timp ce tehnicile de imprimare 3D au devenit instrumente puternice pentru fabricarea substituenților, reproductibilitatea și controlul calității sunt provocări cruciale care trebuie abordate pentru a folosi substituenții imprimați 3D la utilizarea clinică³¹. Pe

lângă selecția materialelor, factori precum componentele substituenților, detaliile modelului, proprietățile arhitecturale și designul biomimetic joacă un rol semnificativ în guvernarea bioactivității care ajută la remodelarea și regenerarea osoasă¹⁰. Construcțiile 3D produse prin tehnici diferite, în timp ce folosesc același material compozit, au prezentat diferențe notabile în morfologie, rugozitatea suprafeței, porozitate și ratele de degradare. Aceste variații au condus la proprietăți mecanice și răspunsuri celulare distincte²⁸.

Capitolul 3. Articol de recenzie *in extenso*

Creșterea fracturilor osteoporotice la nivel mondial încurajează cercetarea în inginerie a țesutului osos să găsească soluții noi, îmbunătățite, atât pentru biomaterialele utilizate în proiectarea substituenților osoși, cât și pentru agenții anti-osteoporotici capabili să promoveze regenerarea osoasă. Această studiu își propune să raporteze cele mai recente progrese în biomateriale prin discutarea tipurilor de biomateriale și a proprietăților acestora, cu un accent special pe compozitele polimer-ceramice. Utilizarea hidroxiapatitei în combinație cu polimeri naturali/sintetici poate profita de proprietățile fiecărei componente a compozitelor și are un potențial mare în ingineria țesutului osos. O comparație între beneficiile și potențialele limitări ale diferitelor metode de fabricare a substituenților duce la o conștientizare sporită a provocărilor cu care se confruntă cercetarea în tratarea fracturii osteoporotice. Progresele în tehnicile de imprimare 3D oferă modalități de fabricare a substituenților 3D îmbunătățiți, complecși și specializați, capabili să furnizeze factori terapeutici direct la locul defectului osteoporotic, într-o manieră predefinită, care este esențială pentru a optimiza rata de osteointegrare/vindecare. Printre acești factori, stronțitul are potențialul de a crește osteointegrarea, osteogeneza și rata de vindecare. Ranelatul de stronțiu, precum și alți agenți biologici activi sunt cunoscuți a fi eficienți în tratarea osteoporozei datorită proprietăților anti-resorbitive, dar și anabolice, dar are efecte adverse care pot fi reduse/evitate prin eliberarea locală din biomateriale. În acest mod, încorporarea acestor agenți în materiale compozite polimer-ceramice poate avea aplicații clinice semnificative pentru regenerarea oaselor osteoporotice fracturate limitând sau înlăturând riscurile asociate cu administrarea sistemică.

Capitolul 4. Scopul tezei și originalitatea

Această teză își propune să dezvolte substituenți imprimați 3D cu mai multe straturi, compuse din 70% wt. PCL și 30% wt. SrHA prin tehnica FDM, precum și 10% g/v GelMA și 5% g/v SrHA prin tehnica DLP, ambele cu concentrații diferite de Sr. Două tipuri de HA/SrHA, de formă diferită (cu forma alungită și sferică), au fost sintetizate prin metode distincte, PR și HT, și caracterizate temeinic din punct de vedere chimic și morfologic. De asemenea, pentru fiecare tip de SrHA, am folosit un interval mare de conținut de Sr, și anume rapoartele molare Sr/(Ca + Sr) de 1, 5, 10, 20 și 30%.

Noutatea acestei teze constă în dezvoltarea de substituenți inovatori imprimați 3D din materiale compozite cu SrHA, pentru eliberarea controlată pe termen lung a Sr în situsul osos dorit, în timp ce se compară suplimentar efectul metodelor de sinteză PR și HT și conținutul diferit de Sr asupra proprietățile substituenților. Noii substituenți imprimați 3D, cu proprietăți fizico-chimice și biologice îmbunătățite, sunt concepuți pentru a repara defectele osoase, în special cele cauzate de osteoporoză, și pentru a reduce efectele secundare în comparație cu administrarea orală de ranelat de Sr ca medicament antiosteoporoză.

Prin urmare, în prezenta teză sunt luate în considerare două direcții de cercetare, bazate pe proprietățile anti-osteoporotice ale SrHA:

1. Dezvoltarea eficientă de substituenți imprimați 3D prin FDM cu 70% wt. PCL și 30% wt. SrHA. SrHA a fost încorporată în rețeaua PCL pentru a crește suprafeța și bioactivitatea substituenților. Morfologia suplimentară a suprafeței filamentului a crescut expunerea și disponibilitatea particulelor ceramice, conducând la un efect sinergic benefic asupra proprietăților suprafeței. Acest lucru a dus la o îmbunătățire notabilă a bio-mineralizării. În timp ce studiile similare care implică PCL și HA sunt destul de abundente, această combinație dintre PCL și SrHA este mai puțin studiată și, după cunoștințele noastre, conținutul și designul exact al acestui tip de substituenți nu au fost folosite înainte pentru a compara efectul a două tipuri diferite de sinteze ale SrHA.

2. Dezvoltarea de substituenți prin imprimare 3D de tipul DLP din materiale compozite 10% (g/v) GelMA și 5% (g/v) SrHA. SrHA a fost încorporat în matricea GelMA pentru a crește caracteristicile mecanice și performanțele de gonflare și degradare a substituenților. Deși studiile privind substituenții din materiale compozite GelMA și HA imprimate 3D prin DLP exista, cercetările despre GelMA și SrHA sunt limitate, iar combinația exactă de conținut și design este unică. Comparația dintre efectele celor două tipuri diferite de sinteză SrHA asupra proprietăților substituenților se adaugă la noutatea tezei.

Obiectivele principale au fost realizate prin intermediul mai multor obiective intermediare, detaliate mai jos:

- Sinteza nanomaterialelor HA/SrHA, cu intenția de a utiliza HA ca control în timp ce se utilizează SrHA ca sursa de Sr pentru regenerarea osoasă;
- Caracterizarea morfologică, structurală și biologică a nanomaterialelor HA/SrHA;
- Dezvoltarea de substituenți din materiale compozite PCL și SrHA prin design CAD și mai multe iterații de imprimare 3D prin extrudare;
- Caracterizarea morfologică, structurală și biologică a substituenților din materiale compozite PCL și SrHA;
- Dezvoltarea de substituenți din materiale compozite GelMA și SrHA prin design CAD și mai multe iterații de imprimare 3D prin DLP;
- Caracterizarea morfologică, structurală și biologică a substituenților din materiale compozite GelMA și SrHA.

Toate rezultatele obținute în activitățile noastre de cercetare descrise mai jos au fost publicate în jurnale peer-reviewed. În ceea ce privește finalizarea acestei teze, au fost publicate patru articole, avându-l ca prim autor pe doctorand (unul a fost o lucrare de recenzie și trei dintre ele au fost articole de cercetare originale). Lucrarea de recenzie detaliază motivele în alegerea SrHA ca agent anti osteoporotic, în timp ce articolele originale prezintă proiectarea de noi substituenți din materiale compozite imprimate 3D bazate pe SrHA, cu diferite concentrații de Sr, sintetizate prin metode co-PR și HT.

Partea a doua: Contribuții originale

Capitolul 5: Materiale și metode

Materiale

Pentru sinteza HA și SrHA, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, Sigma Aldrich, $\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$, Fluka și $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, Sigma Aldrich, au fost utilizați ca precursori. Pelete de poli(e-caprolactonă) (greutate molară medie 45 kDa) au fost achiziționate de la Sigma Aldrich. Pentru sinteza GelMA am folosit ca reactivi gelatina (tip A) provenita din piele de porc, Sigma Aldrich (greutate medie molar 50—100 kDa) și anhidrida metacrilică, Sigma Aldrich (greutate molară 154,16 g/mol). Fenil-2,4,6-trimetilbenzoilfosfinat de litiu (gr. mol 294,10 g/mol) a servit drept fotoinițiator. Toate substanțele utilizate au fost clasificate în scopuri analitice și detalii suplimentare sunt disponibile în articolele publicate incluse în teză, în Capitolul 6.

Metode de caracterizare

În această secțiune au fost descrise metodele de caracterizare utilizate în cercetarea noastră. Ne-am concentrat pe principiile generale pentru a obține o înțelegere aprofundată a motivelor din spatele utilizării lor în investigarea proprietăților, atât a pulberilor HA/SrHA, cât și a substituenților din materiale compozite. Mai multe detalii despre utilizarea lor explicită în cercetarea noastră sunt disponibile în articolele publicate incluse în teză, în Capitolul 6.

Proiectarea și printarea de substituenți

Pentru prima direcție studiată (PCL/SrHA), grupul nostru de cercetare a lucrat cu 3D Bioplotter®, care este considerată cea mai veche bioimprimantă 3D comercială. 3D Bioplotter® poate imprima hidrogeluri încărcate cu celule, cum ar fi gelatină, fibrină, alginat și agaroză, precum și polimeri și materiale ceramice anorganice precum particule de PCL, HA și TCP pentru a crea substituenți⁵⁹.

Fișierele CAD sunt esențiale în imprimarea 3D, formând baza procesului. Software-ul CAD este utilizat pentru a genera fișiere STL, care servesc ca intrare pentru software-ul

imprimantei. De asemenea, în munca noastră, pasul inițial a presupus proiectarea structurilor cilindrice cu un diametru de 10 mm și o înălțime de 2,52 mm cu ajutorul software-ului Bioplotter RP 3.0. Structurile au fost apoi tăiate la grosimea corespunzătoare a stratului, mai mică decât diametrul vârfului acului. A fost selectată o grosime a stratului de 360 μm, puțin mai mică decât diametrul interior al vârfului acului de 400 μm.

Obiectul 3D a fost construit folosind fișierele BPL, care sunt folosite pentru a salva proiectul tăiat și sunt compatibile cu software-ul Visual Machines. După ce a atribuit materialul capului robotului, dispozitivul a procedat la imprimarea substituenților cilindrici. Compozitele pe bază de PCL au fost realizate folosind 70% wt. PCL (Mn 45000) și 30% wt. HA/SrHA. Pentru a asigura o dispersie mai bună a HA, a fost folosită o sită de 45 μm înainte de amestecarea acesteia cu PCL. Materialele compozite au fost plasate în seringă din oțel inoxidabil a capului de distribuție și încălzite la 130°C timp de 15 minute pentru a obține o pastă topită și omogenă. Substituenții de forma cilindrică au fost imprimați la o temperatură constantă strat cu strat pentru a crea o structură rectangulară de formă circulară. Distanța dintre fire a fost ajustată la 0,6 mm. Diametrul firului a fost ajustat la 0,4 mm (diametrul interior al acului). Intervalul care separă firele indică dimensiunea porilor fiecărui substituent și a fost stabilit la 0,4 mm.

Pentru a doua direcție studiată (GelMA/SrHA), am lucrat cu Anycubic Photon D2 DLP care cu ajutorul unor oglinzi concentrează lumina direct pe fundul cuvei de rășină. Deși această imprimantă 3D este evaluată ca fiind una destinată utilizatorilor nespecializați⁶⁰, a fost folosită în alte studii privind aplicațiile de regenerare osoasă⁶¹. Are o interfață tactilă ușor de utilizat, care simplifică operarea, făcând-o foarte accesibilă.

Software-ul imprimantei convertește modelele 3D în straturi tăiate, ghidând proiecția luminii pentru fiecare strat. Fișierele de proiectare asistată de computer (CAD) care conțin instrucțiunile pentru substituenți au fost proiectate folosind SolidWorks, salvate ca fișiere .stl și tăiate prin Chitubox, software-ul încorporat al imprimantei 3D Anycubic Photon D2 bazată pe DLP. Substituenții au fost proiectați să aibă dimensiunea de 18 × 18 × 1,3 mm și să conțină 3 × 3 macropori, în scopul de a arăta capacitățile de imprimare ale materialului (Figura 7). Distanța dintre pori a fost setată la 3 mm. Mărimea

porilor a fost setată la 2 mm. Dimensiunea laterală a fost setată la 18 mm. Probele au fost liofilizate înainte de alte analize. Imaginile SEM indică faptul că probele au păstrat o formă similară cu cea intenționată prin imprimare 3D (Figura 8).

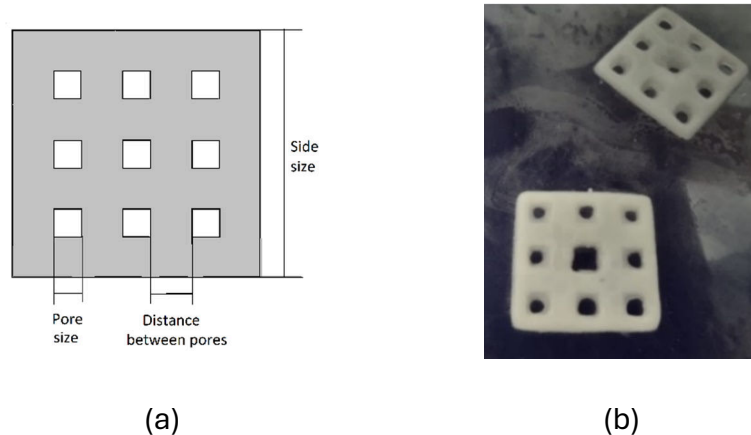


Figura 7. Ilustrarea schematică a substituenților (a) și imaginea macroscopică reprezentativă (b).

Cea mai importantă dificultate în regenerarea osoasă ghidată de substituenți este de a asigura un aport adecvat de sânge pentru a evita potențialele deficiențe în neovascularizare, ischemie ulterioară și necroză. Prevenirea acestor dificultăți includ accelerarea angiogenezei în cadrul substituenților sau utilizarea vascularizației existente pentru a asigura o cantitate suficientă de sânge. Caracteristicile designului substituenților, cum ar fi porozitatea, dimensiunea porilor și interconectivitate, sunt vitale pentru a permite infiltrarea vaselor preexistente și a celulelor care formează vase.

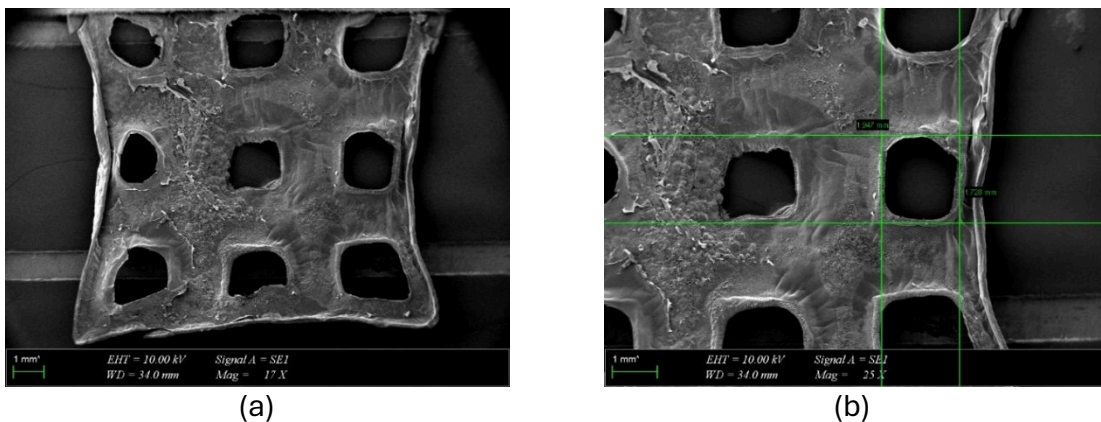


Figura 8. Substituenți GelMA după liofilizare. Imagini SEM reprezentative la: (a) mărire 17 X, (b) mărire 25 X. Capitolul 6: Articole originale in extenso

Capitolul 6: Articole originale *in extenso*

Articolul 2: Substituenți imprimați 3D din materiale compozite care conțin poli-ε-caprolactonă și hidroxiapatită dopată cu stronțiu pentru refacerea oaselor afectate de osteoporoză

O provocare în ingineria tisulară și în sectorul farmaceutic este dezvoltarea de sisteme de eliberarea locală controlată a medicamentelor care ridică probleme atunci când sunt administrate sistemic. Stronțiul este un exemplu de agent anti-osteoporotic eficient, utilizat în tratarea osteoporozei datorită mecanismele de acțiune atât anti-resorbitive cât și anabolice. Proiectarea substituenților osoși cu o mai mare capacitatea de a promova regenerarea osoasă este un subiect de cercetare de actualitate. În acest studiu am dezvoltat materiale compozite tridimensionale (3D) multistrat pentru ingineria țesutului osos pe bază de nanohidroxiapatită (HA), nano-hidroxiapatită cu conținut de Sr (SrHA) și poli-ε-caprolactonă (PCL) prin tehnica de fabricare prin extrudare a materialului. HA și SrHA obținute anterior cu diverse conținuturi de Sr au fost utilizate pentru materialul compozit. Compatibilitatea chimică, morfologică și biologică au fost investigate. Materialele compozite printate 3D au arătat o bună citocompatibilitate și potențial osteogen, ceea ce este în mod specific recomandat în aplicații când este necesară o mineralizare mai rapidă, cum ar fi tratamentul osteoporozei.

Metode de caracterizare a substituenților imprimați 3D din materiale compozite

Analiza termogravimetrică (TG) a fost efectuată utilizând un instrument Mettler Toledo TGA/SDTA851e sub un flux de aer sintetic de 80 ml/min, utilizând vase ceramice deschise. Viteza de încălzire a fost ajustată la 10 °C/min și intervalul de temperatură a fost între 25 °C și 800 °C.

Măsurătorile SEM au fost efectuate folosind un microscop electronic cu scanare cu pistol cu emisie de câmp (FEG-SEM) Quanta Inspect F50, cu o rezoluție de 1,2 nm. Au fost observate morfologiile de suprafață ale probelor precum și dimensiunea firelor. Pregătirea probei a inclus imersarea în azot lichid și ruperea schelelor folosind lovituri ușoare de pistil, acoperire cu aur și, ulterior, fixarea eșantionului pe butuci de aluminiu folosind

bandă de carbon. Imaginile au fost colectate prin software-ul echipamentului. Pentru a determina diametrele medii ale firelor și porilor (diametrul Feret) din imaginile SEM, a fost utilizat software-ul ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, SUA). Macromorfologia substituenților din PCL, PCL-HA și PCL-SrHA (Figurile 1 a și b) indică o bună conformitate cu modelul CAD. Substituenții prezintă o structură poroasă macroscopică regulată și sunt multistratificate. Firele sunt bine definite și observate clar atât macroscopic, cât și microscopic (Figura 1 c). Nu este nicio diferență evidentă între substituenți.

Proprietăți mecanice. Toate testele au fost efectuate pe probe cilindrice la temperatura camerei folosind Shimadzu Autograph AGS-X 20kN (Shimadzu, Tokyo, Japonia). Diametrul și grosimea tuturor probelor au fost măsurate înainte de testare. Testarea a fost efectuată la o rată de încărcare constantă de 0,5 mm/min și o încărcare maximă de 4000 N.

Bioactivitatea chimică *in vitro* a fost evaluată după imersarea probelor în soluție de fluid corporal simulat (SBF) la 37 °C timp de 28 de zile cu ajutorul SEM cuplat cu spectroscopie EDX, precum și prin măsurarea pe tot parcursul experimentului a greutatei probelor, pH-ul și conductibilitatea SBF. A fost folosit un pH-metru inoLab Multi 9630 IDS (Xylem, DC, US). Prepararea soluției de SBF a fost efectuată conform rețetei și procedurii lui Kokubo [29]. SBF nu a fost reîmprospătat în timpul experimentului. După imersie, probele au fost îndepărtate din mediul SBF, clătite cu apă deionizată și uscate la temperatura camerei. Probele au fost analizate folosind SEM și raze X cu dispersie de energie (EDX) pentru a determina formarea stratului de apatită pe suprafața schelelor după 28 de zile.

Evaluare biologică *in vitro*. Pre-osteoblastele de șoarece (linia celulară MC3T3-E1) au fost crescute în mediu Dulbecco Modified Eagle (Invitrogen, SUA) cu 10% ser fetal bovin (Gibco, SUA) la 37°C într-o atmosferă umidificată cu 5% CO₂. Celulele au fost însămânțate la o densitate celulară de 6×10^4 celule/cm² pe suprafața plastică a culturii de țesut (TCPS), care a servit drept control, pe partea superioară a probelor care au fost anterior sterilizate sub lumină UV timp de 2 ore. După 24 de ore de incubare în condiții standard au fost efectuate testele de biocompatibilitate.

Viabilitatea celulară a fost măsurată utilizând testul cu 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliu (Sigma-Aldrich, SUA) (MTT). Mediul de cultură a fost îndepărtat la sfârșitul timpului de incubare și celulele au fost incubate cu 1 mg/mL soluție MTT timp de 2 ore la 37°C. Cristalele de formazan violet formate în celulele viabile au fost dizolvate cu 2-propanol (Sigma-Aldrich, SUA) și absorbanta a fost măsurată la 595 nm folosind un cititor de microplăci (FlexStation 3, Molecular Devices, SUA).

Concentrația de oxid nitric (NO) în mediul de cultură colectat după cele 24 de ore de incubare a fost măsurată folosind reactivul Griess, o soluție stoechiometrică (v/v) de diclorhidrat de naftiletildiamină 0,1%, sulfanilamidă 1% în acid fosforic 5%). Absorbanta amestecului format din volume egale de supernatanți medii și reactiv Griess a fost citită la 550 nm folosind un cititor de microplăci și concentrația de NO a fost calculată din curba standard NaNO₂.

Mediul de cultură a fost recoltat după 24 de ore de creștere a osteoblastelor în prezența probelor testate și utilizat pentru măsurarea eliberării de lactat dehidrogenază (LDH) cu Cytotoxicity Detection KitPLUS (Roche, SUA), urmând instrucțiunile producătorului. Volumele de 100 uL de supernatanți de cultură au fost amestecate cu 100 uL amestec de catalizator și soluție de colorant și incubate timp de 20 de minute într-un loc întunecat. După ce reacția a fost oprită, absorbanta a fost citită la 490 nm folosind un cititor de microplăci (Flex Station 3, Molecular Devices, SUA).

După incubare, celulele au fost fixate cu 4% paraformaldehidă timp de 20 de minute și permeabilizate cu 0,1% Triton X-100 – 2% albumină serică bovină timp de 45 de minute. Filamentele de actină au fost colorate cu 10 ug/ml faloidin-FITC (izotiocianat de fluoresceină) iar nucleeele au fost colorate cu 2 ug/ml DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol). Pentru a captura imaginile a fost folosit un microscop cu fluorescență inversată Olympus IX71. Testele in vitro au fost efectuate în trei exemplare și rezultatele au fost calculate ca medie ± abaterea standard (SD) a trei experimente independente. Analiza statistică a fost efectuată pe trei replici per probă prin testul t Student nepereche, iar diferențele au fost considerate semnificative pentru o valoare p mai mică de 0,05.

Analize statistice. Datele sunt reprezentate ca medie \pm abaterea standard (S.D.). Graficele și analiza statistică au fost realizate folosind software-ul MS Excel. Datele au fost comparate utilizând analiza unidirecțională a varianței (ANOVA), urmată de un test t cu două cozi. Valorile $p < 0,05$ au fost considerate semnificative statistic.

Rezultate și discuții

Designul substituenților din PCL 70% - HA/SrHA 30%. Macromorfologia schelelor PCL, PCL-HA și PCL-SrHA (Figurile 1 a și b) indică o bună conformitate cu modelul CAD. Substituenții prezintă o structură poroasă macroscopică multistratificată. Firele sunt bine definite și observate clar atât macroscopic, cât și microscopic (Figura 1 c). Nu era nicio diferență evidentă între probe.

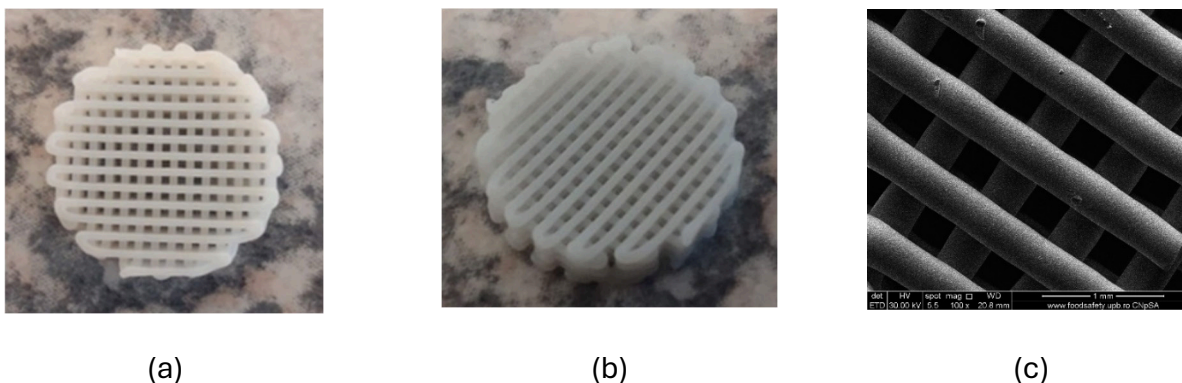


Figura 1. Substituenți PCL 70% (wt.) - SrHA 30% (wt.) obținuți folosind pulbere HAHTSr10%: (a) vedere macroscopică de sus, (b) vedere laterală macroscopică, (c) imagini SEM cu vedere de sus în modul EDT.

O suprafață specifică mai mare are o relație directă cu creșterea adsorbției macromoleculilor și proteinelor, în special a celor implicate în inducerea osteogenezei. Se recomandă ca diametrul porilor interconectați să fie de cel puțin 300 μm pentru a permite migrarea corectă a celulelor în interiorul grefelor și angiogeneza adecvată, care sunt două dintre cele mai importante aspecte pentru formarea de țesut osos nou în porii existenți³⁰. Macroporii substituenților obținuți au fost măsurați din micrografiile SEM utilizând software-ul ImageJ (Figura 2), iar rezultatele obținute sunt similare recomandărilor găsite în

literatură, ca diametrul mediu al porilor sa varieze între 230-320 μm . Rezultatele sunt similare, cu diferențe semnificative statistic doar pentru probele cu 1%Sr..

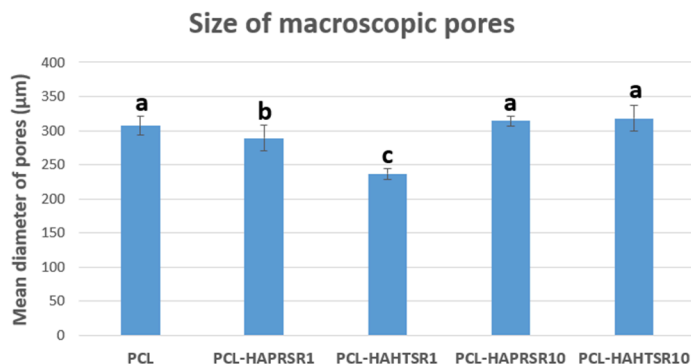


Figure 2. Valorile diametrului macroporilor la compozite PCL și 70% PCL - 30% SrHA. Rezultatele sunt reprezentate ca medie \pm SD; litere diferite indică diferențe semnificative între fiecare probă ($p < 0,05$)..

Măsurătorile TG au fost efectuate pe substituenți imprimați 3D pentru a cuantifica conținutul de HA/SrHA la sfârșitul procesului de fabricare al acestora. O probă de ~ 12 mg în greutate a fost încălzită la 800°C cu o viteză de $10^\circ\text{C}/\text{min}$, iar pierderea în greutate a probei a fost înregistrată în timp. În plus, pentru control, o granulă de PCL (~ 15 mg în greutate) a fost testată în același mod. Analiza TG a fost utilizată pentru a evalua compoziția (% în greutate) a materialelor compozite preparate prin tehnica de amestecare în topitură, precum și stabilitatea lor termică. Toate materialele compozite au avut compoziții experimentale apropiate de valoarea de proiectare de 70% PCL și 30% HA/SrHA, așa cum se vede în Tabelul 1. Toate probele au demonstrat un profil de descompunere într-o singură etapă cu o singură temperatură de tranziție și stabilitate termică similară, cu descompunerea începând cu aproximativ 250°C ; totuși, probele compozite par a termina degradarea la o temperatură mai scăzută în comparație cu probele simple PCL, așa cum se vede în Figura 3 pentru compozitele care conțin HAPRSr10% și HAHTSR10%. Acest lucru se poate datora unui efect catalitic al acestor pulberi și, cel mai probabil, unei conductivități termice mai bune în interiorul masei.

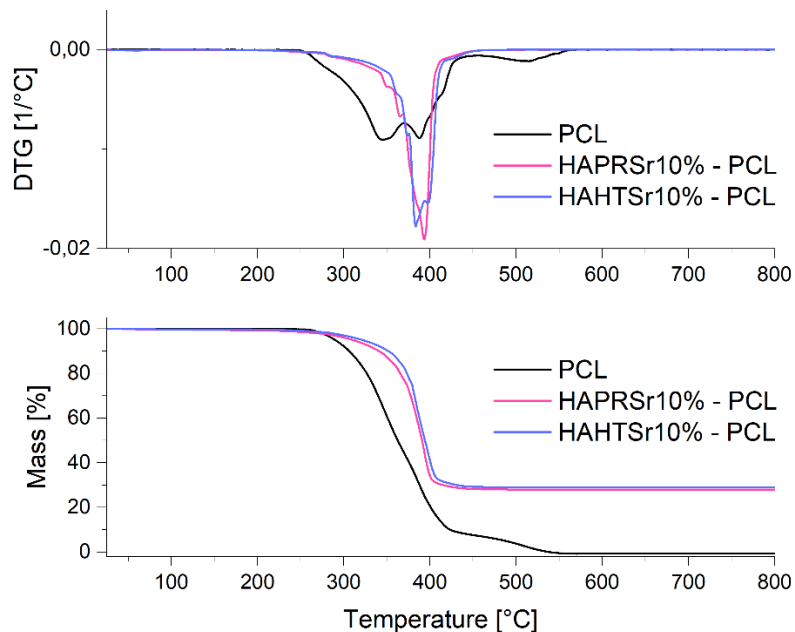


Figura 3. Măsurătorile TG/DTG pe probele de PCL și compozite care conțin HAPRSr10% și HAHTSr10%.

Având în vedere faptul că componenta ceramică HA/SrHA este singura componentă care nu se descompune în timpul procesului TGA, se poate presupune că pe parcursul întregii prelucrări nu se obțin eterogenități, iar compoziția finală este apropiată de cea dorită, pentru toate probele cu HA/SrHA obținute prin precipitare sau hidrotermal.

Tabel 1. Măsurătorile TG pe compozite 70% PCL - 30% HA/SrHA..

Proba	Metoda de sinteza	Sr/(Ca+Sr) (%)	Continutul determinat in probe (% wt.)	
			HA/SrHA	PCL
PCL-HAPRSr1	Precipitare	1	28.7	71.3
PCL-HAPRSr5		5	29.2	70.8
PCL-HAPRSr10		10	28.7	71.3
PCL-HAPRSr20		20	28.4	71.6
PCL-HAPRSr30		30	27.3	72.7

PCL-HAHTSr1	Hidrotermal	1	29.1	70.9
PCL-HAHTSr5		5	28.8	71.2
PCL-HAHTSr10		10	29.4	70.6
PCL-HAHTSr20		20	28.7	71.3
PCL-HAHTSr30		30	28.8	71.2

Pentru a investiga morfologia suprafeței probelor obținute și dimensiunile firelor, a fost efectuată analiza SEM. Evaluarea morfologică a probelor imprimate 3D la diferite mărimi indică faptul că acestea au afișat un nivel ridicat de fidelitate față de modelul CAD original (Figurile 4, 5 și 6), cu o arhitectură a porilor complet deschisă și interconectată. Diametrul firului a fost măsurat folosind software-ul ImageJ pentru mai multe probe (Figura 7), iar valoarea medie a fost apropiată de valoarea țintă teoretică a acului de imprimare (400 μm). Firele PCL au avut valori mai mari semnificative statistic decât firele probelor din compozite, datorită comportamentului tipic al biomaterialelor pe bază de polimeri vâscoelastici, care tind să se extindă la extrudarea din duză [31]. Cu toate acestea, nu au fost observate diferențe semnificative între compozitele care conțin 10%Sr.

Imaginile obținute la o magnificație mai mare utilizând scanarea de deasupra și modul de electroni retroîmprăștiți (CBS) au evidențiat prezența particulelor SrHA și micro-porozitatea pe suprafața tuturor probelor analizate (Figura 8). Suprafața filamentelor compozite a apărut mai puțin netedă decât a celor din PCL. Micropori mai mulți și mai mici pot fi observați în cazul probelor compozite, în comparație cu cele din PCL. Acest lucru s-ar putea datora ciocnirii particulelor ceramice cu regiunile cristaline PCL care cresc în timpul solidificării, așa cum menționează alți autori [32]. Imaginile în secțiune transversală, chiar și la o magnificație mai mică indică aglomerarea particulelor ceramice în probele pe bază de compozit atât în modurile CBS, cât și în modul Everhart-Thornley Detector (ETD) (Figura 5 și 6), dar nu există o aglomerare critică, ceea ce înseamnă că s-au obținut materiale omogene.

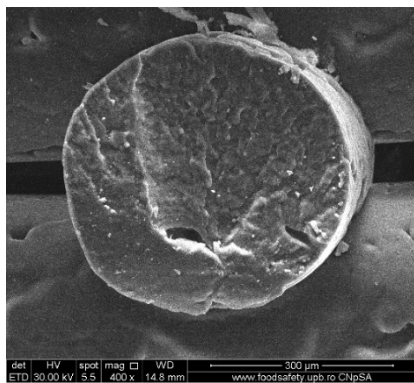
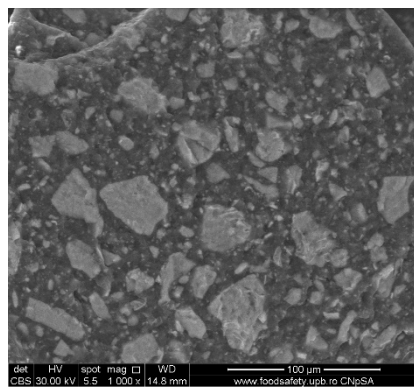
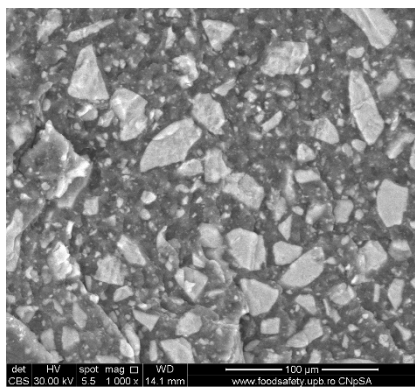
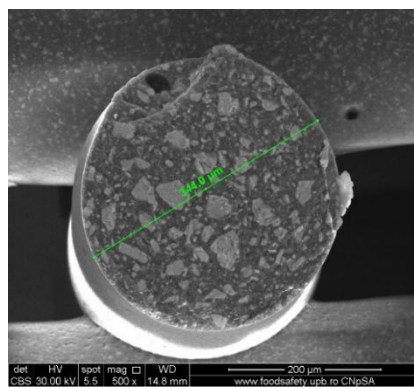
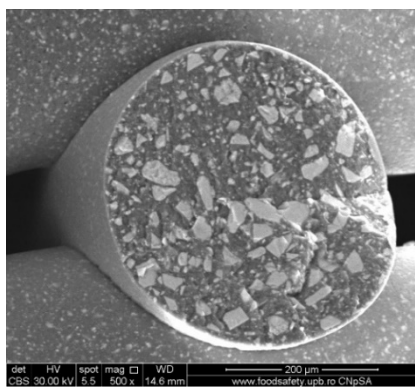
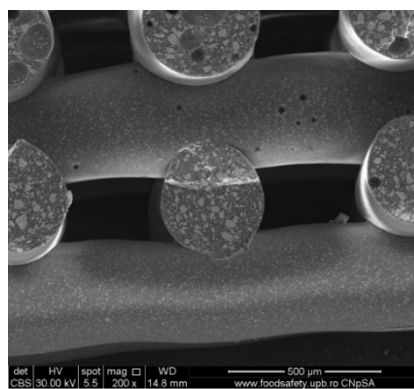
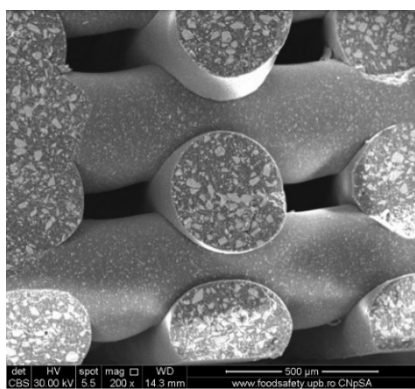
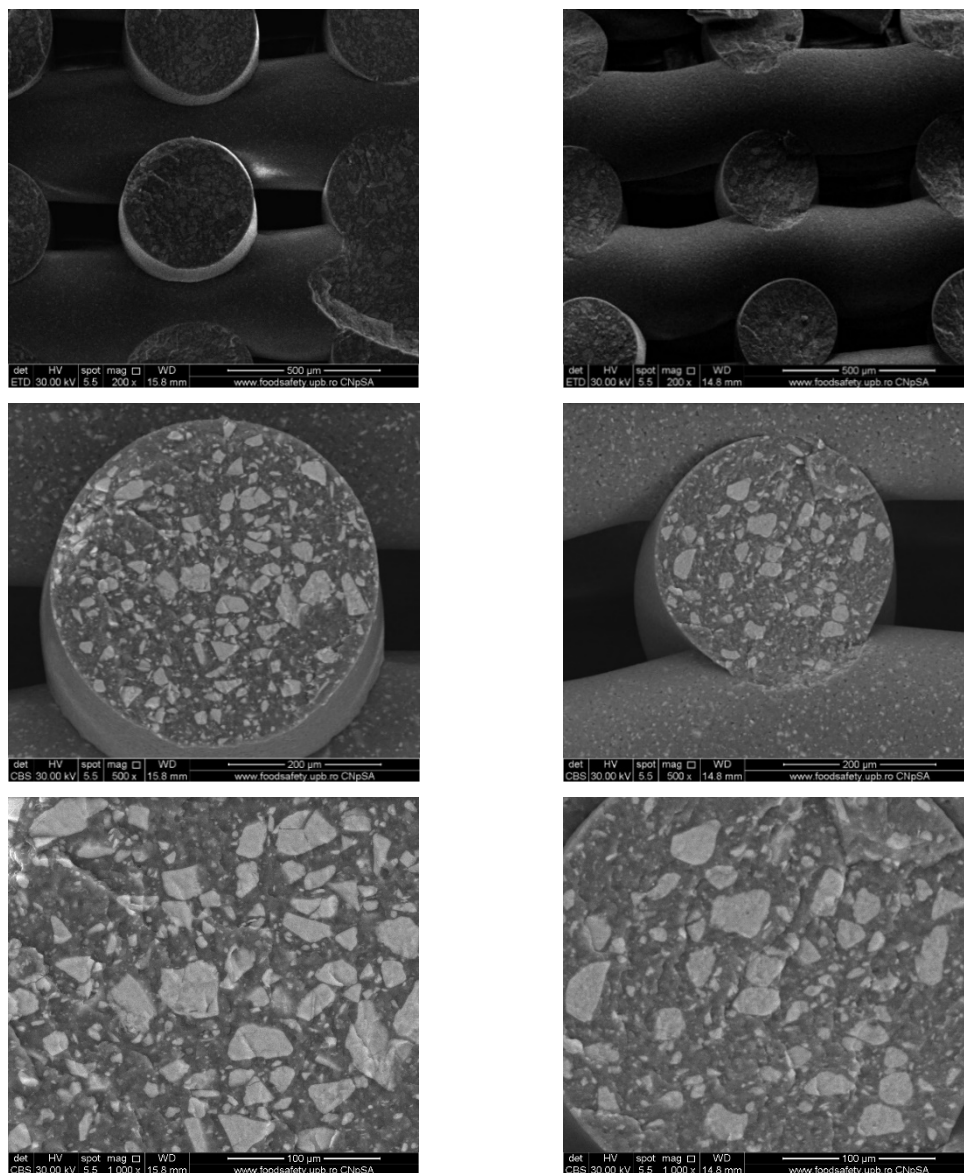


Figura 4. Imagini SEM în secțiune transversală ale probelor 100% PCL.



(a) (b)
Figura 5. Imagini SEM în secțiune transversală ale probelor compozite 70% PCL - 30% SrHA: (a) PCL – HAPR-Sr1%, (b) PCL – HAPR-Sr10%.



(a) (b)
Figura 6. Imagini SEM ale probelor compozite 70% PCL - 30% SrHA (a) PCL – HAHT-Sr1%, (b) PCL – HAHT-Sr10%.

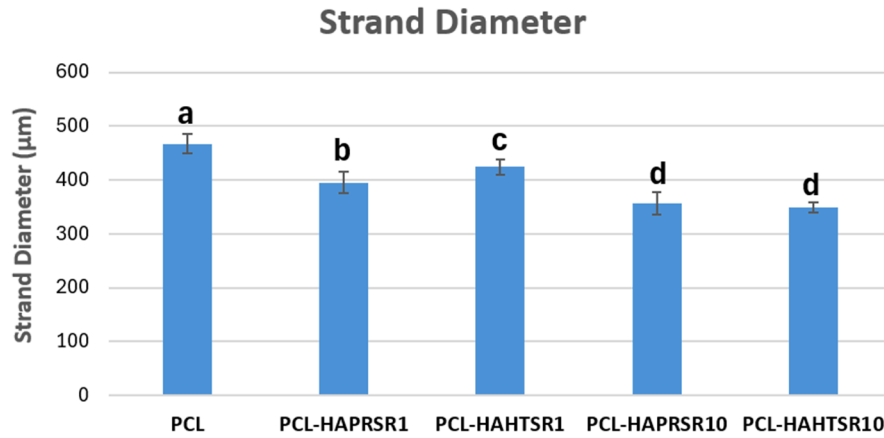


Figura 7. Valorile diametrului firului extrudat pentru probele de PCL și compozite 70% PCL - 30% SrHA. Rezultatele sunt reprezentate ca medie ± SD; litere diferite indică diferențe semnificative între fiecare probă ($p < 0,005$).

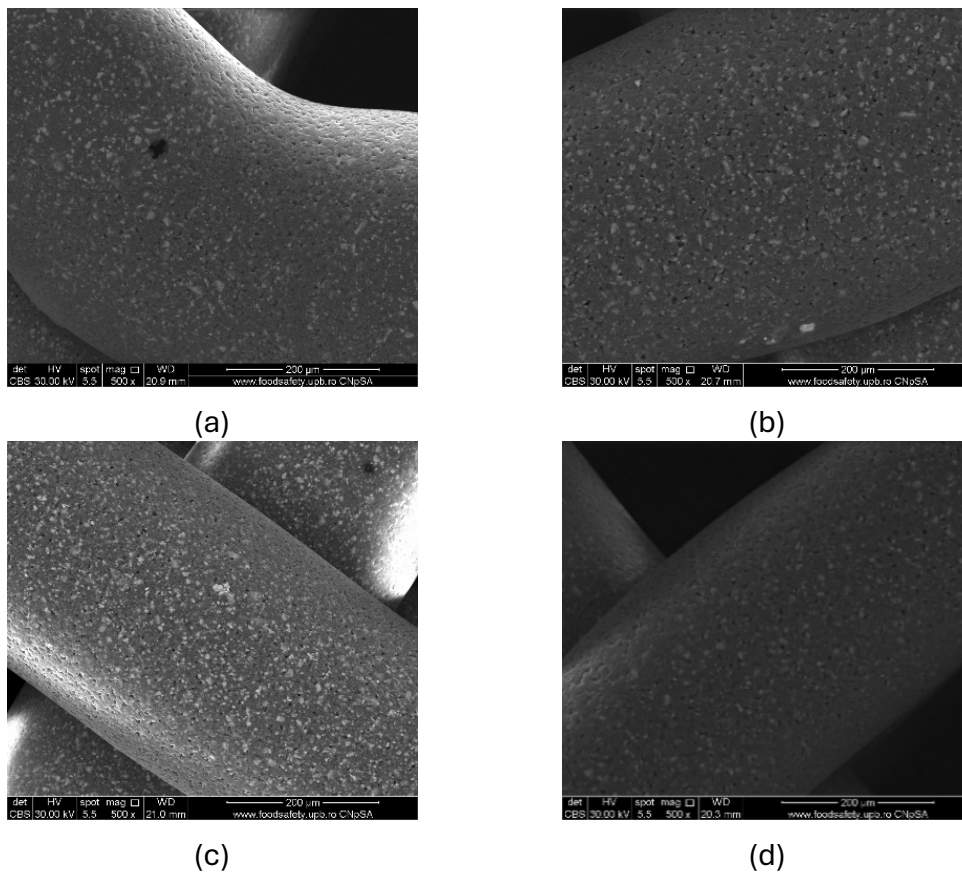


Figura 8. Imagini SEM de deasupra ale probelor de compozite 70% PCL - 30% SrHA printate 3D: (a) PCL – HAPR-Sr1%, (b) PCL – HAHT-Sr1%, (c) PCL – HAPR-Sr10%, (d) PCL – HAHT-Sr10%.

Suprafața probelor este foarte importantă deoarece aceasta este în contact direct cu fluidele, celulele și țesuturile din jur. Suprafețele dezvăluie particule de HA parțial încorporate în matricea polimerică, dar și pori micrometrici. Rugozitatea suprafeței este importantă deoarece poate permite o mai bună interacțiune celulă-grefă și, prin urmare, o mai bună atașare a celulei pe suprafață. Porii au fost analizați cantitativ cu ajutorul ImageJ și prezentați folosind diametrul Feret mediu (Figura 9). Dimensiunea medie a fost similară în toate probele compozite, fără diferențe semnificative statistice, dar diferită din punct de vedere statistic de proba PCL care a prezentat polidispersitate în formă de pori și un diametru mediu mai mare. Aceste măsurători indică faptul că porii observați se află în intervalul de diametru optim pentru aderența celulară (1-10 μm în diametru), similar cu microstructura matricelor extracelulare decelularizate derivate din țesuturi și organe[33]. Porii de suprafață cu dimensiunea de 3-12 μm sunt importanți pentru contactele directe celulă-celulă și migrațiune[34]. Împreună cu macroporii mai mari obținuți în mod intenționat prin proiectarea CAD, acești pori mai mici creează o arhitectură a porilor pe mai multe nivele care promovează în mod substanțial aderența, viabilitatea și proliferarea celulelor.

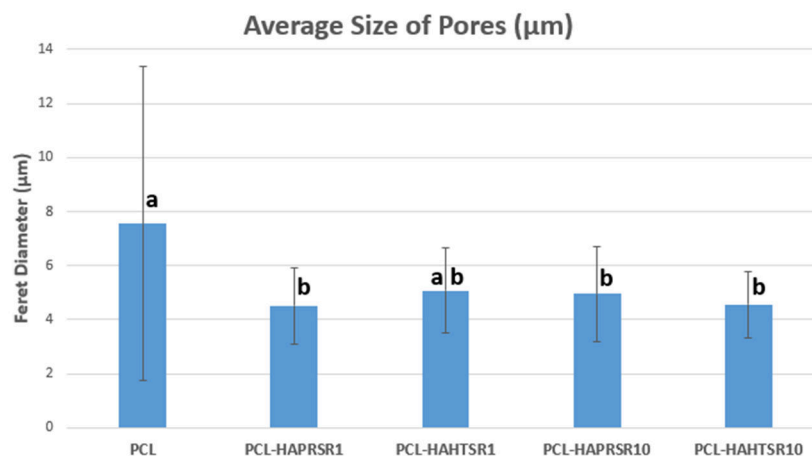
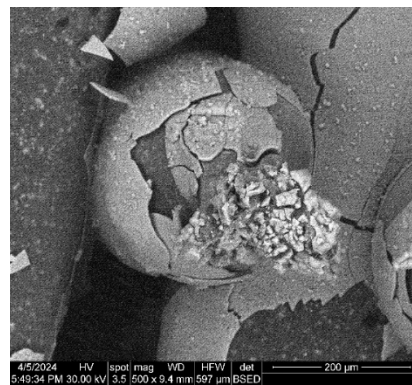
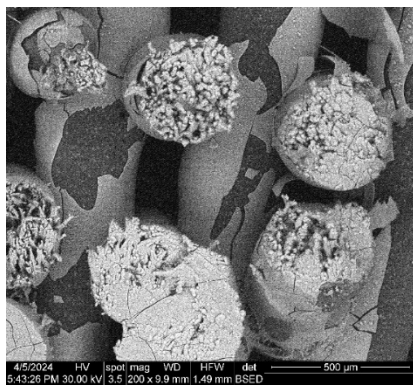
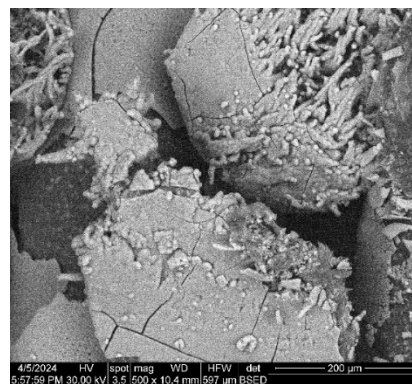
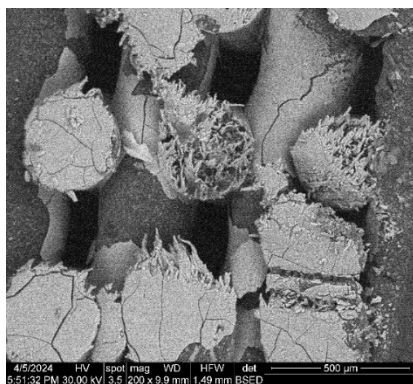


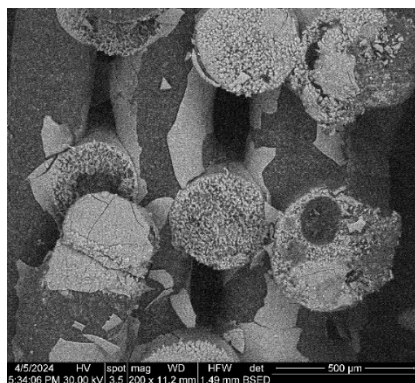
Figura 9. Dimensiunea medie a porilor utilizând măsurătorile diametrului Feret pe probe de PCL și compozite 70% PCL - 30% SrHA. Rezultatele sunt reprezentate ca medie \pm SD; literele diferite indică diferențe semnificative între fiecare probă ($p < 0,05$).

Morfologia substituenților din materiale compozite a fost evaluată după imersiunea de 28 de zile în fluid corporal simulat (SBF) utilizând microscopia electronică cu scanare (SEM), iar rezultatele sunt prezentate în figurile 15 și 16. După imersare, caracteristicile suprafeței, cum ar fi porii și rugozitatea, au rămas neschimbate de către SBF. Cu toate acestea, a fost detectată o acoperire continuă de apatită, de aproximativ 6 μm grosime, pe toate probele, susținută de analiza EDX. În mod deosebit, a fost observată o tendință de fisurare sau exfoliere a stratului de apatită în toate probele, indicând o potențială aderență inadecvată între suprafața schelei (în special PCL) și acoperirea minerală. Factori precum variațiile pH-ului, schimbul de ioni și dizolvarea componentelor (HA) pot influența stabilitatea și integritatea acoperirii minerale. Imaginile SEM în secțiune transversală au dezvăluit pori umpluți cu apatită în cadrul schelei și formarea de aglomerate micronice. Aceste rezultate implică eficacitatea schelelor în promovarea mineralizării, dar subliniază necesitatea unei optimizări suplimentare a protocoalelor de fabricație și a strategiilor de proiectare a materialelor pentru a îmbunătăți aderența și durabilitatea stratului de apatită pe schele imprimare 3D.

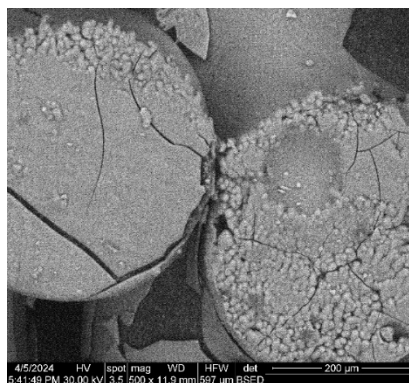


(a)

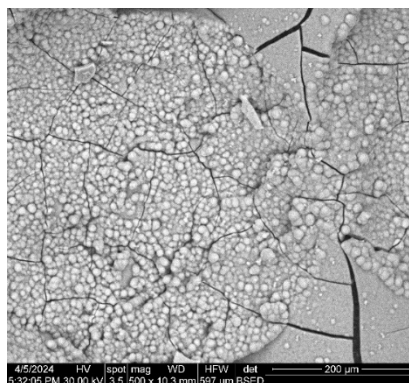
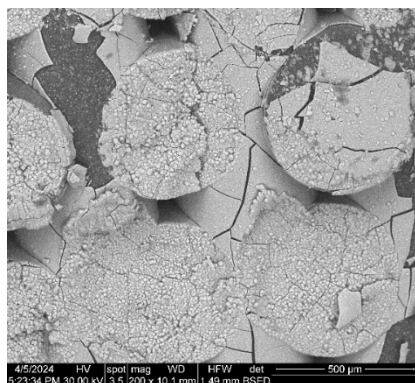




(b)

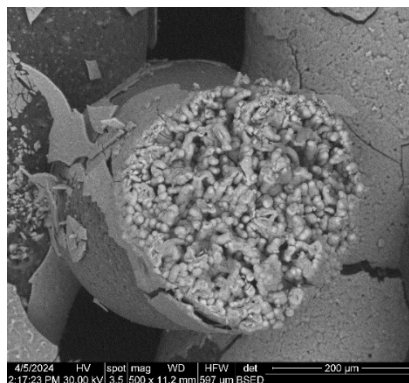
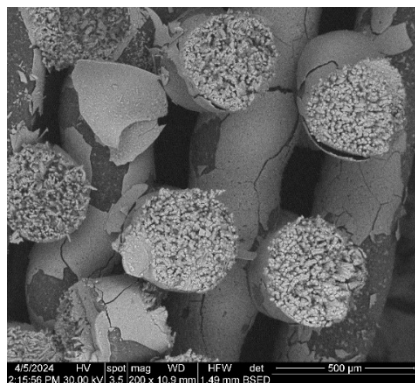


(c)



(d)

Figura 15. Imagini SEM ale compozitelor imprimate 3D care conțin SrHA obținute prin precipitare, după 28 de zile de imersare în SBF: (a) PCL-HAPR-Sr1%, (b) PCL-HAPR-Sr5% (c) PCL-HAPR-Sr10% (d) PCL-HAPR-Sr20%.



(a)

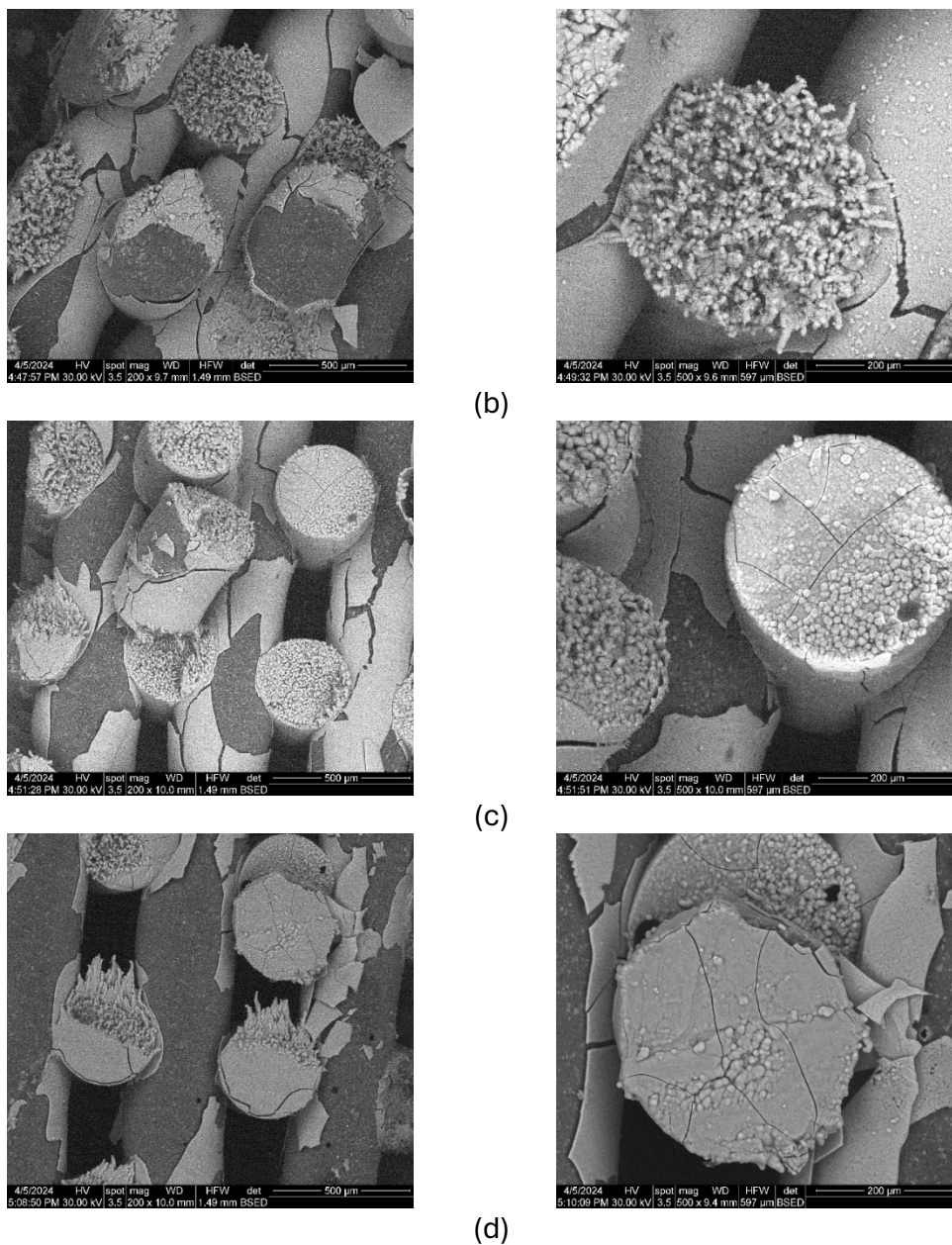


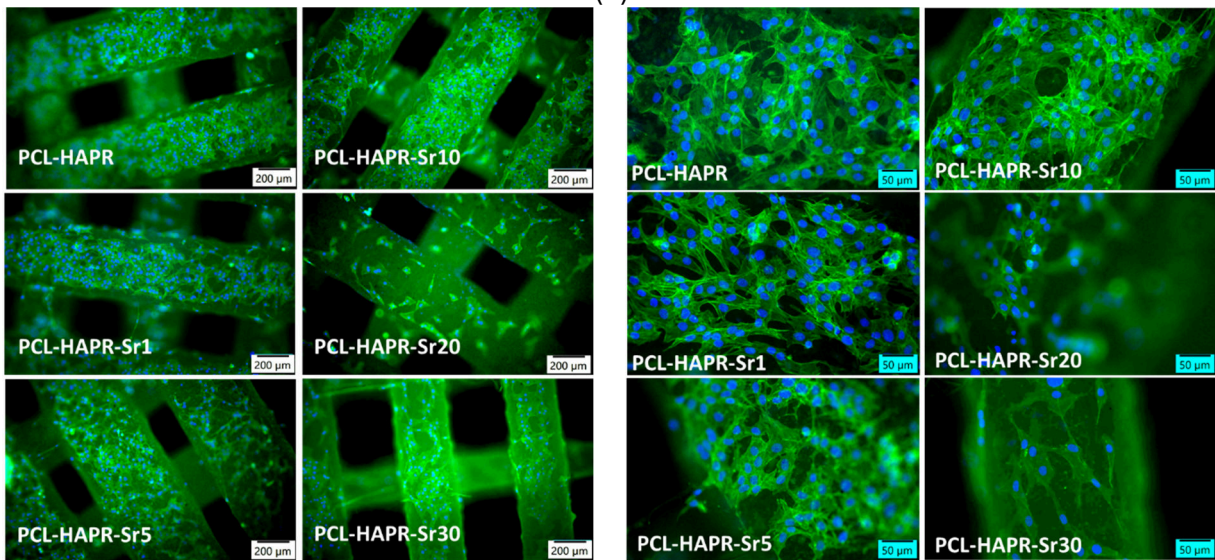
Figura 16. Imagini SEM ale compozitelor imprimate 3D care conțin SrHA obținută hidrotermal, după 28 de zile de imersare în SBF: (a) PCL-HAHT-Sr1%, (b) PCL-HAHT-Sr5% (c) PCL-HAHT- Sr10% (d) PCL-HAHT-Sr20%

Pentru a evalua biocompatibilitatea diferitelor tipuri de substituenți imprimați 3D, a fost efectuată colorarea cu F-actină a celulelor MC3T3-E1 atașate pe suprafața acestor materiale. Imaginile prezentate în Figura 17. au relevat o bună aderență a acestor celule pentru toate tipurile de probe testate, fiind distribuite pe toată suprafața acestora după 24

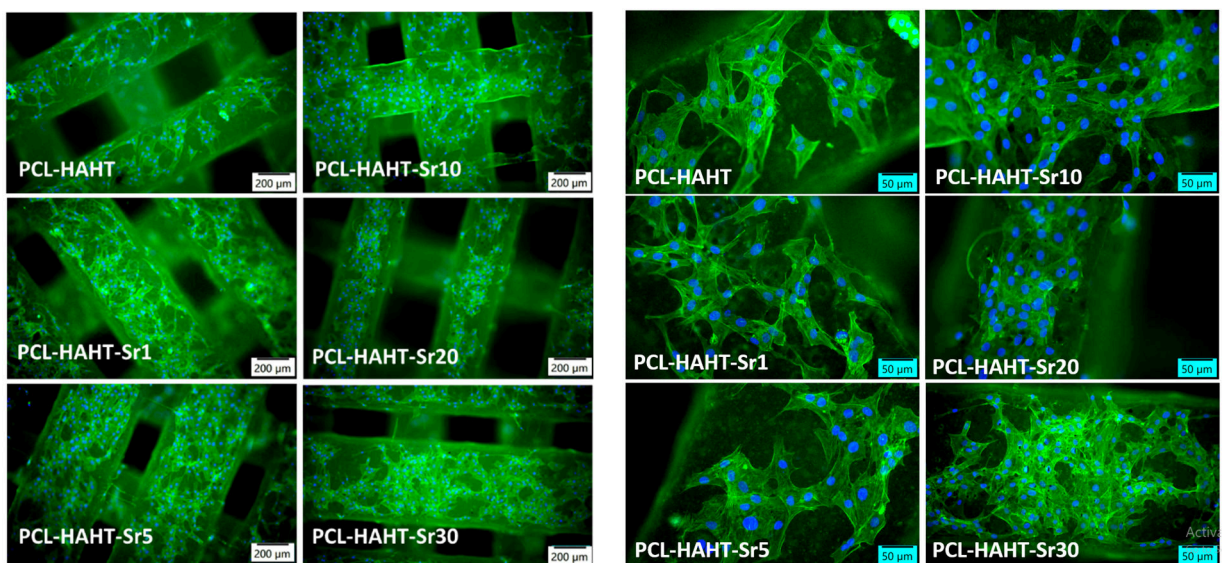
de ore de incubație. O bună citocompatibilitate a fost observată pentru proba PCL (Figura 17 a), așa cum a fost raportată anterior²⁷. În cazul probelor care conțin SrHA obținute prin precipitare, cea mai bună morfologie celulară a fost obținută pentru Sr1, 5 și 10 (Figura 17 b). Pentru probele pe bază de HAHT, adăugarea de Sr crește atașarea celulară în comparație cu proba PCL-HAHT (Figura 17 c). Analiza imaginilor surprinse la o magnificație mai mare a indicat o densitate celulară mai mare pentru PCL-HAPR, PCL-HAPR-Sr1, 5 și 10, observându-se o rețea organizată de filamente de actină cu numeroase joncțiuni celulă-celulă, care sugerează un osteoblast funcțional. În plus, a fost demonstrată o bună interacțiune celulară pentru PCL-HAHT-Sr30.



(a)



(b)



(c)

Figura 17. Imagini reprezentative ale microscopiei cu fluorescență cu magnificații diferite după 24 de incubare care arată colorarea citoscheletului de actină în pre-osteoblastele MC3T3-E1 atașate pe suprafața probelor imprimate 3D: (a) care conține doar PCL, (b) conțin SrHA obținută prin precipitare (c) care conține SrHA obținută hidrotermal. F-actina a fost colorată în verde cu faloidin-FITC și nucleele în albastru cu DAPI.

Adziunea relativă celulară a fost investigată pentru toate probele folosind imagini de microscopie cu fluorescență. Imaginile au fost analizate cantitativ cu ajutorul ImageJ și rezultatele au fost prezentate ca număr mediu de celule (Figura 18). În cazul compozitelor care conțin SrHA obținute prin precipitare, rezultatele sunt mai mari pentru concentrații mai mici de Sr, în timp ce în cazul probelor care conțin SrHA obținută hidrotermal rezultate mai bune au fost la concentrații mai mari, în afară de PCL – HAHT-Sr20%. Deși probele de PCL au avut și rezultate bune, confirmând natura biocompatibilă a acestui polimer și utilitatea sa în dezvoltarea de noi materiale compozite, se consideră că îmbunătățirea adusă de HA/SrHA adăugat este mai vizibilă pe perioade mai lungi de timp [27].

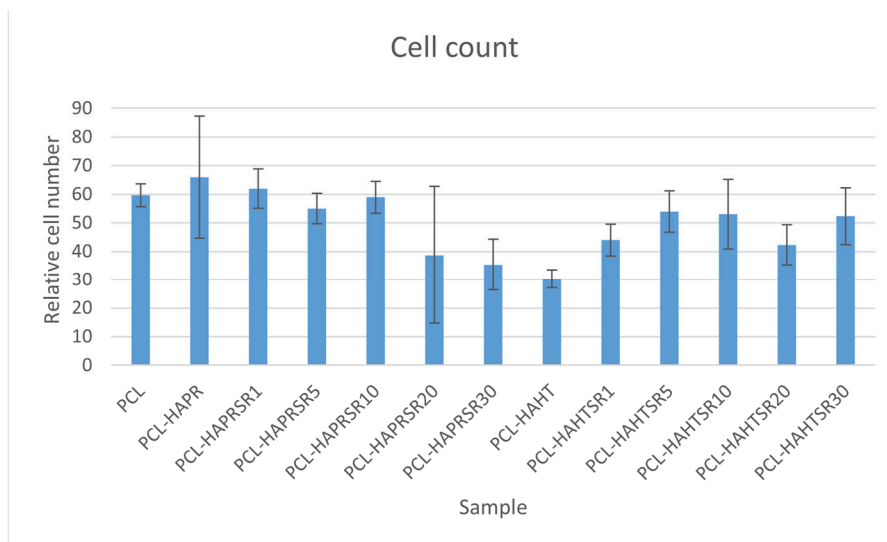


Figura 18. Analiza cantitativă a aderenței celulare pe probe după 24 de ore de incubare.

Rezultatele sunt reprezentate ca medie ± SD (n=3).

Citocompatibilitatea bună a tuturor substituenților a fost confirmată de activitatea metabolică a osteoblastelor MC3T3-E1 măsurată prin test MTT (Figura 19 a), nefiind diferențe importante între probe. Cu toate acestea, cele mai scăzute valori au fost observate în cazul Sr20, pentru ambele tipuri de HA. În plus, evaluarea biologică a inclus examinarea celulelor atașate la suprafața de plastic a vasului de cultură, sub substituenți. Colorația cu F-actină a relevat o atașare ridicată a pre-osteoblastelor (Figura S3 din Informații suport), nefiind perturbate de materiale, confirmând biocompatibilitatea acestora pentru celulele învecinate în cazul aplicării ingineriei tisulare. Mai mult, nivelul de NO a fost neschimbat în comparație cu celulele de control (neexpuse la materiale), sugerând că substituenții nu au indus inflamație (Figura 19 b). În cazul eliberării de LDH, cel mai înalt nivel a fost obținut după incubarea cu PCL-HAPR-Sr20, fiind în acord cu rezultatele testului MTT (Figura 19 a) și colorării cu F-actină (Figura 17). În acest caz, adeziunea scăzută ar putea fi corelată cu o pierdere a integrității membranei celulare.

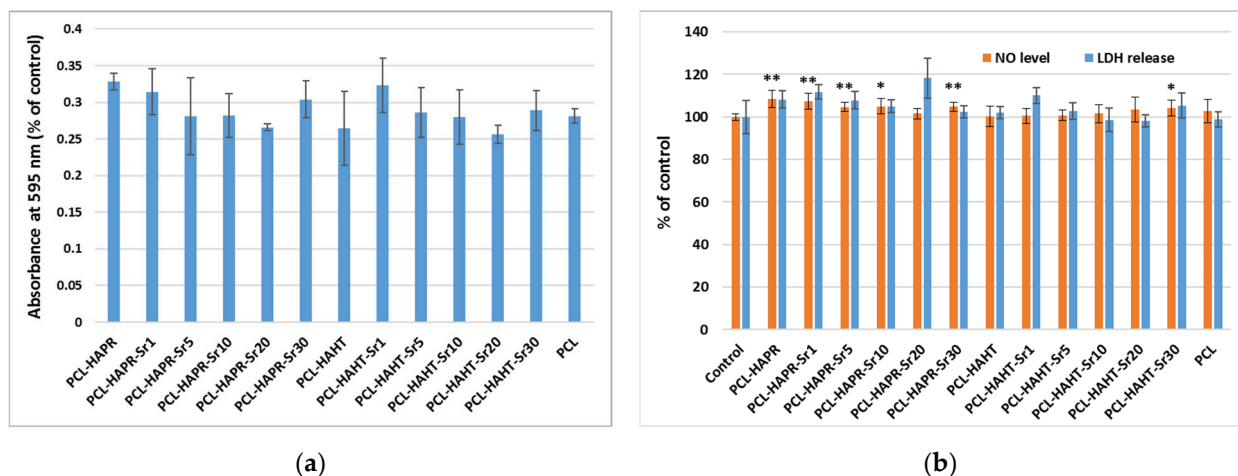


Figura 19. Evaluarea biocompatibilității probelor imprimate 3D, care conțin PCL și HA/SrHA obținute prin precipitare și hidrotermal, după 24 de ore de incubare cu pre-osteoblaste MC3T3-E1 prin măsurarea viabilității celulelor atașate pe aceste probe: (a) Viabilitatea celulară a fost evaluată prin test MTT și reprezentată ca medie \pm SD (n=2); (b) Nivelul de NO și eliberarea de LDH în mediul de cultură. Rezultatele au fost calculate ca medie \pm SD (n=3) și exprimate în raport cu martorul (celule incubate fără probe) pentru testele NO și LDH (*p < 0,05 și **p < 0,01 în comparație cu martor).

Concluzii

Materialele compozite PCL 70% - HA/SrHA 30% au fost obținute prin amestecare prin topire și utilizate pentru imprimarea 3D a substituenților prin tehnica FDM. Amestecarea prin topire este simplă, eficientă din punct de vedere al costurilor și evită citotoxicitatea asociată cu reziduurile de solvenți. Tehnica FDM este simplă de utilizat, fiabilă și capabilă să pună în practică proiecte complexe. Designul substituenților 3D a fost potrivit pentru performanța biologică generală datorită aranjamentului adecvat al firelor, grosimii stratului și porozității. Rezultatele experimentale indică faptul că substituenții 3D obținuți favorizează aderența și proliferarea pre-osteoblastelor atașate acestor suprafețe, evitând dezavantajele asociate cu o slabă integrare a biomaterialelor din cauza interacțiunii lor scăzute cu celulele.

Per total s-au obținut rezultate bune, deși în cazul colorației cu F-actină, cea mai bună morfologie celulară a fost obținută pentru concentrații mai mici de Sr, iar ulterior, în

cazul eliberării LDH, cel mai înalt nivel a fost obținut după incubarea cu PCL-HAPR- Sr20, fiind în acord cu rezultatele testului MTT și a colorării cu F-actină. Scăderea adeziunii ar putea fi corelată cu o pierdere a integrității membranei celulare. Pe baza viabilității celulare, a analizei cantitative a adeziunii celulare și a proprietăților mecanice, considerăm că probele care conțin SrHA cu o concentrație mai mică de Sr sunt mai potrivite pentru aplicațiile în țesutul osos. De asemenea, comparând rezultatele generale între compozitele care conțin HA/SrHA obținute prin diferite metode de sinteză, considerăm că este recomandată metoda precipitării. Metoda de sinteză prin precipitare are avantajele suplimentare de a fi mai simplă, ușoară, mai puțin costisitoare și, după cum s-a arătat anterior²³, are o structură mai amorfă și o compoziție ce integrează ionii de carbonat, capabilă să se integreze mai bine în țesutul gazdă datorită asemănărilor cu apatita naturală.

Strategia de fabricație aplicată în acest studiu poate fi utilizată pentru dezvoltarea de substituenți mai complecși și specifici pacientului, permițând includerea unor substanțe bioactive suplimentare în aceste compozite care se potrivesc mai bine cu nevoile specifice ale pacientului în ce privește țesutul osos. Este de așteptat ca strategii similare să poată fi utilizate pe scară largă și, astfel, materiale asemănătoare să evolueze ca un dispozitiv medical de ultimă generație pentru gestionarea fracturilor de osteoporoză sau chiar a altor defecte osoase.

Bibliografie selectivă Articolul 2

[27]. Rezania, N.; Asadi-Eydivand, M.; Abolfathi, N.; Bonakdar, S.; Mehrjoo, M.; Solati-Hashjin, M. Three-Dimensional Printing of Polycaprolactone/Hydroxyapatite Bone Tissue Engineering Scaffolds Mechanical Properties and Biological Behavior. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2022, 33, 31.

[29]. Kokubo, T.; Takadama, H. How Useful Is SBF in Predicting in Vivo Bone Bioactivity? *Biomaterials* 2006, 27, 2907–2915.

[31]. Mancuso, E.; Shah, L.; Jindal, S.; Serenelli, C.; Tsikriteas, Z.M.; Khanbareh, H.; Tirella, A. Additively Manufactured BaTiO₃ Composite Scaffolds: A Novel Strategy for Load Bearing Bone Tissue Engineering Applications. *Mater. Sci. Eng. C* 2021, 126, 112192.

[32]. Porta, M.; Tonda-Turo, C.; Pierantozzi, D.; Ciardelli, G.; Mancuso, E. Towards 3D Multi-Layer Scaffolds for Periodontal Tissue Engineering Applications: Addressing Manufacturing and Architectural Challenges. *Polymers* 2020, 12, 2233.

[33]. Jakus, A.E.; Geisendorfer, N.R.; Lewis, P.L.; Shah, R.N. 3D-Printing Porosity: A New Approach to Creating Elevated Porosity Materials and Structures. *Acta Biomater.* 2018, 72, 94–109.

Capitolul 7: Concluzii generale și perspective

Obiectivele principale ale acestei teze au fost dezvoltarea și caracterizarea substituenților din materiale compozite imprimabile 3D pentru aplicații de inginerie a țesutului osos compuse din 70% wt. PCL și 30% wt. SrHA prin tehnica FDM, precum și 10% g/v GelMA și 5% g/v SrHA prin tehnica DLP, ambele cu concentrații diferite de Sr. Pe baza metodei de sinteză s-au obținut două tipuri de SrHA, prin precipitare (PR) și, respectiv, hidrotermal (HT). Acest lucru ne permite să comparăm cele două metode pentru a crea o înțelegere mai aprofundată a influenței pe care sinteza ceramicii o are asupra proprietăților substituenților din materiale compozite. Fiecare component al substituenților din materiale compozite a fost caracterizat temeinic.

Pulberile de HA/SrHA sintetizate au fost caracterizate din punct de vedere al compoziției chimice, cristalinității și morfologiei folosind EDX, XRD, SEM și TEM. Ambele protocoale de sinteză au produs cu succes HA prezentând raporturi Ca:P asemănătoare cu valoarea stoichiometrică de 1,67. HA obținut prin PR a prezentat o formă rotundă, în timp ce HA obținut prin HT a prezentat o morfologie în formă de tijă. SrHA a fost integrat în matricea PCL pentru a forma compozitul utilizat pentru obținerea substituenților 3D. Substituenți PCL – SrHA au fost fabricați prin tehnologia asistată de presiune a 3D Bioplotter de la EnvisionTEC. A fost încorporată atât HA/SrHA obținută prin PR cât și cea obținută prin HT la o concentrație de ±30% wt., prezentând o formă circulară cu un model

de rectangular, un fir cu diametru de 360 μm , și 600 μm între fire, având 8 straturi. Procesul de imprimare a fost optimizat pentru a obține structuri stratificate cu porozitate deschisă. Substituenții din materiale compozite PCL – HA/SrHA imprimate 3D au fost bine caracterizate. Analiza TG a fost folosită pentru a evalua procentul de componente anorganice și organice ale compozitelor. SEM a fost folosit pentru a observa detaliile morfo-structurale ale suprafeței și secțiunii transversale ale substituenților, oferind perspective asupra microstructurii și porozității acestora. Analizele vizuale ale imaginilor SEM au evidențiat o dispersie similară a HA/SrHA în PCL pentru toate probele. Caracteristicile mecanice ale substituenților au fost evaluate pentru a asigura alinierea cu forțele pe care trebuie să le suporte osul în timpul funcționării normale. Evaluarea bioactivității chimice a fost efectuată pentru a determina capacitatea substituenților de a interacționa și de a se amesteca satisfăcător în țesutul osos autentic. În cele din urmă, a fost efectuată examinarea citotoxicității pentru a evalua biocompatibilitatea și capacitatea substituenților de a evita reacțiile adverse, asigurând siguranța acestora în aplicațiile de inginerie a țesutului osos. Testele de compresie efectuate pe substituenții din materiale compozite au indicat valori generale similare cu cele pentru substituenții pe bază de PCL. Au fost observate mici diferențe între substituenții care conțin HA/SrHA obținute prin PR și prin HT. În general, probele cu SrHA obținută prin PR a avut rezultate mai bune. Aceste distincții au fost atribuite caracteristicilor componentei ceramice.

SrHA a fost, de asemenea, folosită pentru a fabrica substituenți din materiale compozite GelMA – HA/SrHA prin imprimare 3D bazată pe tehnica DLP. GelMA fotocurabilă cu un grad aproximativ de substituție, de 75,4% grade de metacrilolare a fost sintetizată din gelatină din piele de porc (tip A) și anhidridă metacrilică la diferite concentrații. Amestecuri 10% g/v GelMA și 5% g/v SrHA au fost apoi fotopolimerizate folosind litu fenil-2,4,6-trimetilbenzoil fosfinat (LAP) ca fotoinițiator și o sursă de lumină UV la 405 nm și 12 mW/cm^2 pentru a obține geluri fotopolimerizate. S-a observat că proprietățile mecanice ale compozitelor din hidrogel se îmbunătățesc prin adăugarea de SrHA. Compozitele reticulate rezultate au fost analizate în ce privește compoziția chimică folosind spectroscopie FTIR pentru a confirma reticularea reușită a materialului. Structura și

morfologia lor externă au fost evaluate prin SEM. Analizele de gonflare au fost efectuate pe substituenții din materiale compozite pe bază de GelMA liofilizate, demonstrând o rată scăzută de gonflare. Evaluările capacității de gonflare ale compozitului pe bază de GelMA liofilizat au prezentat procente mai mici de gonflare în comparație cu GelMA simplu. Analizele structurale și morfologice ale substituenților din materiale compozite pe bază de GelMA au fost efectuate folosind TG, SEM, relevând diferențe corelate cu categoria și concentrația de HA/SrHA în compozite.

O abordare potențială pentru îmbunătățirea proprietăților mecanice și chimice ale hidrogelurilor este de a încorpora o componentă ceramică, profitând de biocompatibilitatea ceramicii și rezistența sporită. Eforturile viitoare vor explora crearea de substituenți GelMA – SrHA cu conținut diferit de SrHA. Produsele rezultate trebuie să fie supuse unei analize care să cuprindă proprietățile mecanice, structurile interne și externe, precum și comportamentele de gonflare și degradare. Mai mult, pot fi generați noi substituenți din materiale compozite imprimate 3D prin explorarea metodelor alternative de reticulare. Această abordare ar putea facilita crearea de structuri cu forme mai precise și proprietăți mecanice personalizabile.

Provocările și direcțiile viitoare de cercetare pentru diverse aplicații medicale 3D includ îmbunătățirea rezoluției de imprimare, a vitezei și a repetabilității în ingineria țesuturilor, precum și creșterea interacțiunilor celulare și a migrației în medicina regenerativă. Pentru replicile de țesut proiectate, integrarea structurilor neuronale și vasculare este crucială. Crearea de organe complet funcționale, de dimensiuni comune, necesită combinarea imprimării celulare cu alte tehnici de biofabricare.

Toate biomaterialele care conțin Sr, obținute în acest studiu, au prezentat proprietăți superioare în comparație cu analogii lor fără Sr. Prin urmare, substituenții proiectați au evidențiat perspective încurajatoare pentru materialele pe bază de SrHA cu activitate antiosteoporoză. Rezultatele pot încuraja această direcție de cercetare către faza viitoare prin efectuarea de teste *in vivo* pentru a dovedi utilizarea în siguranță a acestor materiale ca sursă locală de Sr în zonele osoase afectate. Proiectarea și imprimarea 3D a substituenților poate promova gestionarea într-un mod individualizat a diferitelor boli

osoase. Profilul de eliberare al unei substanțe active ar putea fi adaptat nevoilor pacientului. De asemenea, forma macroscopică a substituenților și performanțele mecanice pot fi adaptate tipului de țesut osos ce urmează a fi restaurat. De asemenea, considerăm că substituenții fabricați îndeplinesc indicatorii cheie pentru utilizarea eficientă a acestora, și care includ porozitate ridicată, o structură a porilor complet interconectată și o rată de degradare treptată a biomaterialului¹⁸.

Pe scurt, acest studiu ilustrează fezabilitatea proiectării substituenților 3D din materiale compozite cu conținut de stronțiu folosind diverse materiale și tehnologii de fabricație. Această abordare permite fabricarea de structuri compozite cu proprietăți fin reglate prin ajustarea designului, materialelor alese și concentrației acestora, metodelor și gradelor de reticulare. Structurile compozite produse în acest studiu au rezultate promițătoare pentru aplicațiile de inginerie tisulară, în special în cazurile care necesită repararea și regenerarea osului, dar au potențial și pentru interfețele diferitelor țesuturi, cum ar fi cazul interfețelor osteocondrale.

Capitolul 8: Lista publicațiilor și participărilor la conferințe naționale

Articole publicate incluse în teză (autor principal)

a) Articol de recenzie:

1. **Codrea, C.I.**; Croitoru, A.-M.; Baci, C.C.; Melinescu, A.; Fici, D.; Fruth, V.; Fici, A. Advances in Osteoporotic Bone Tissue Engineering. *Journal of Clinical Medicine* 2021, 10, 253. <https://doi.org/10.3390/jcm10020253> (IF - 4.242 - Q1);

b) Articole originale de cercetare:

2. **Codrea, C.I.**; Lincu, D.; Atkinson, I.; Culita, D.C.; Croitoru, A.-M.; Dolet, G.; Trusca, R.; Vasile, B.S.; Stan, M.S.; Fici, D.; et al. Comparison between Two Different Synthesis Methods of Strontium-Doped Hydroxyapatite Designed for Osteoporotic Bone Restoration. *Materials* 2024, 17, 1472. <https://doi.org/10.3390/ma17071472> (IF - 3.4 - Q2);

3. **Codrea, C.I.**; Lincu, D.; Ene, V.L.; Nicoară, A.I.; Stan, M.S.; Fikai, D.; Fikai, A. Three-Dimensional-Printed Composite Scaffolds Containing Poly-ε-Caprolactone and Strontium-Doped Hydroxyapatite for Osteoporotic Bone Restoration. *Polymers* 2024, 16, 1511. <https://doi.org/10.3390/polym16111511> (IF - 4.7 - Q1);
4. **Codrea, C.I.**, Baykara, D.; Mitran, R.-A.; Koyuncu, A.C.Ç.; Gunduz, O.; Fikai, A. 3D-Bioprinted Gelatin Methacryloyl-Strontium-Doped Hydroxyapatite Composite Hydrogels Scaffolds for Bone Tissue Regeneration. *Polymers* 2024, 16, 1932. <https://doi.org/10.3390/polym16131932>, (IF - 4.7 - Q1).

IF cumulat: 4.242 + 3.4 + 4.7 + 4.7 = 17,042

Articole publicate legate de subiectul tezei (coautor):

1. Cristina Dumitrescu, Ionela Neacsu, Vasile Surdu, Adrian Nicoara, **Cosmin Codrea**, Cristian Pop, Roxana Trusca, Ecaterina Andronescu; Maturation of hydroxyapatite from biogenic calcium source – a comparative study; Scientific Bulletin of University Politehnica of Bucharest, Series B, Vol. 84, Iss. 1, 2022 (IF – 0.5 - Q4).

Participări la conferințe legate de subiectul tezei:

1. **Cosmin Iulian Codrea**, Daniel Lincu, Irina Atkinson, Alexa Maria Croitoru, Bogdan Stefan Vasile, Adrian Ionut, Nicoară, Vladimir Lucian Ene, Miruna Silvia Stan, Anton Fikai - **3D-Printed Scaffolds for Osteoporotic Bone Restoration based on Poly-ε-Caprolactone and Strontium-Doped Hydroxyapatite**, Applications of Chemistry in Nanosciences and Biomaterials Engineering – NanoBioMat 2024, 19-21 June 2024.

Bibliografie

- (1) Duda, G. N.; Geissler, S.; Checa, S.; Tsitsilonis, S.; Petersen, A.; Schmidt-Bleek, K. The Decisive Early Phase of Bone Regeneration. *Nature Reviews Rheumatology* **2023**, 19 (2), 78–95. <https://doi.org/10.1038/s41584-022-00887-0>.
- (2) Xie, Y.; Zhang, L.; Xiong, Q.; Gao, Y.; Ge, W.; Tang, P. Bench-to-Bedside Strategies for Osteoporotic Fracture: From Osteoimmunology to Mechanosensation. *Bone Research* **2019**, 7 (1), 25. <https://doi.org/10.1038/s41413-019-0066-7>.

- (3) Sterling, J. A.; Guelcher, S. A. Biomaterial Scaffolds for Treating Osteoporotic Bone. *Current Osteoporosis Reports* **2014**, *12* (1), 48–54. <https://doi.org/10.1007/s11914-014-0187-2>.
- (4) Lehman, R. A. J.; Kang, D. G.; Wagner, S. C. Management of Osteoporosis in Spine Surgery. *JAAOS - Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons* **2015**, *23* (4).
- (5) Wei, H.; Cui, J.; Lin, K.; Xie, J.; Wang, X. Recent Advances in Smart Stimuli-Responsive Biomaterials for Bone Therapeutics and Regeneration. *Bone Research* **2022**, *10* (1), 17. <https://doi.org/10.1038/s41413-021-00180-y>.
- (6) Yazdanpanah, Z.; Sharma, N. K.; Raquin, A.; Cooper, D. M. L.; Chen, X.; Johnston, J. D. Printing Tissue-Engineered Scaffolds Made of Polycaprolactone and Nano-Hydroxyapatite with Mechanical Properties Appropriate for Trabecular Bone Substitutes. *BioMedical Engineering OnLine* **2023**, *22* (1), 73. <https://doi.org/10.1186/s12938-023-01135-6>.
- (7) Gordon, A.; Newsome, F.; Ahern, D. P.; McDonnell, J. M.; Cunniffe, G.; Butler, J. S. Iliac Crest Bone Graft versus Cell-Based Grafts to Augment Spinal Fusion: A Systematic Review and Meta-Analysis. *European Spine Journal* **2024**, *33* (1), 253–263. <https://doi.org/10.1007/s00586-023-07941-9>.
- (8) Humbert, P.; Kamleitner, C.; De Lima, J.; Brennan, M. Á.; Lodoso-Torrecilla, I.; Sadowska, J. M.; Blanchard, F.; Canal, C.; Ginebra, M.-P.; Hoffmann, O.; Layrolle, P. Phase Composition of Calcium Phosphate Materials Affects Bone Formation by Modulating Osteoclastogenesis. *Acta Biomaterialia* **2024**, *176*, 417–431. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2024.01.022>.
- (9) Schulze, F.; Lang, A.; Schoon, J.; Wassilew, G. I.; Reichert, J. Scaffold Guided Bone Regeneration for the Treatment of Large Segmental Defects in Long Bones. *Biomedicines* **2023**, *11* (2). <https://doi.org/10.3390/biomedicines11020325>.
- (10) Zhang, S.; Dong, Y.; Chen, M.; Xu, Y.; Ping, J.; Chen, W.; Liang, W. Recent Developments in Strontium-Based Biocomposites for Bone Regeneration. *Journal of Artificial Organs* **2020**, *23* (3), 191–202. <https://doi.org/10.1007/s10047-020-01159-y>.
- (11) Frasnelli, M.; Cristofaro, F.; Sglavo, V. M.; Dirè, S.; Callone, E.; Ceccato, R.; Bruni, G.; Cornaglia, A. I.; Visai, L. Synthesis and Characterization of Strontium-Substituted Hydroxyapatite Nanoparticles for Bone Regeneration. *Materials Science and Engineering: C* **2017**, *71*, 653–662. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.10.047>.
- (12) Tao, Z.-S.; Zhou, W.-S.; He, X.-W.; Liu, W.; Bai, B.-L.; Zhou, Q.; Huang, Z.-L.; Tu, K.; Li, H.; Sun, T.; Lv, Y.-X.; Cui, W.; Yang, L. A Comparative Study of Zinc, Magnesium, Strontium-Incorporated Hydroxyapatite-Coated Titanium Implants for Osseointegration of Osteopenic Rats. *Materials Science and Engineering: C* **2016**, *62*, 226–232. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.01.034>.
- (13) Anandan, D.; Jaiswal, A. K. Synthesis Methods of Hydroxyapatite and Biomedical Applications: An Updated Review. *Journal of the Australian Ceramic Society* **2024**, *60* (2), 663–679. <https://doi.org/10.1007/s41779-023-00943-2>.
- (14) Pierantozzi, D.; Scalzone, A.; Jindal, S.; Stipniece, L.; Šalma-Ancāne, K.; Dalgarno, K.; Gentile, P.; Mancuso, E. 3D Printed Sr-Containing Composite Scaffolds: Effect of Structural Design and Material Formulation towards New Strategies for Bone Tissue

- Engineering. *Composites Science and Technology* **2020**, *191*, 108069. <https://doi.org/10.1016/j.compscitech.2020.108069>.
- (15) You, J.; Zhang, Y.; Zhou, Y. Strontium Functionalized in Biomaterials for Bone Tissue Engineering: A Prominent Role in Osteoimmunomodulation. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* **2022**, *10*.
- (16) Melnik, E. V.; Shkarina, S. N.; Ivlev, S. I.; Weinhardt, V.; Baumbach, T.; Chaikina, M. V.; Surmeneva, M. A.; Surmenev, R. A. In Vitro Degradation Behaviour of Hybrid Electrospun Scaffolds of Polycaprolactone and Strontium-Containing Hydroxyapatite Microparticles. *Polymer Degradation and Stability* **2019**, *167*, 21–32. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2019.06.017>.
- (17) Shuai, C.; Yang, W.; Feng, P.; Peng, S.; Pan, H. Accelerated Degradation of HAP/PLLA Bone Scaffold by PGA Blending Facilitates Bioactivity and Osteoconductivity. *Bioactive Materials* **2021**, *6* (2), 490–502. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2020.09.001>.
- (18) Laubach, M.; Herath, B.; Bock, N.; Suresh, S.; Saifzadeh, S.; Dargaville, B. L.; McGovern, J.; Wille, M.-L.; Hutmacher, D. W.; Medeiros Savi, F. In Vivo Characterization of 3D-Printed Polycaprolactone-Hydroxyapatite Scaffolds with Voronoi Design to Advance the Concept of Scaffold-Guided Bone Regeneration. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* **2023**, *11*.
- (19) Ding, W.; Ge, Y.; Zhang, T.; Zhang, C.; Yin, X. Advanced Construction Strategies to Obtain Nanocomposite Hydrogels for Bone Repair and Regeneration. *NPG Asia Materials* **2024**, *16* (1), 14. <https://doi.org/10.1038/s41427-024-00533-z>.
- (20) Xu, H. H.; Wang, P.; Wang, L.; Bao, C.; Chen, Q.; Weir, M. D.; Chow, L. C.; Zhao, L.; Zhou, X.; Reynolds, M. A. Calcium Phosphate Cements for Bone Engineering and Their Biological Properties. *Bone Research* **2017**, *5* (1), 17056. <https://doi.org/10.1038/boneres.2017.56>.
- (21) Babilotte, J.; Martin, B.; Guduric, V.; Bareille, R.; Agniel, R.; Roques, S.; Héroguez, V.; Dussauze, M.; Gaudon, M.; Le Nihouannen, D.; Catros, S. Development and Characterization of a PLGA-HA Composite Material to Fabricate 3D-Printed Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Materials Science and Engineering: C* **2021**, *118*, 111334. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111334>.
- (22) Mazzoli, A. Selective Laser Sintering in Biomedical Engineering. *Medical & Biological Engineering & Computing* **2013**, *51* (3), 245–256. <https://doi.org/10.1007/s11517-012-1001-x>.
- (23) Laubach, M.; Hildebrand, F.; Suresh, S.; Wagels, M.; Kobbe, P.; Gilbert, F.; Kneser, U.; Holzapfel, B. M.; Hutmacher, D. W. The Concept of Scaffold-Guided Bone Regeneration for the Treatment of Long Bone Defects: Current Clinical Application and Future Perspective. *Journal of Functional Biomaterials* **2023**, *14* (7). <https://doi.org/10.3390/jfb14070341>.
- (24) Rezaia, N.; Asadi-Eydivand, M.; Abolfathi, N.; Bonakdar, S.; Mehrjoo, M.; Solati-Hashjin, M. Three-Dimensional Printing of Polycaprolactone/Hydroxyapatite Bone Tissue Engineering Scaffolds Mechanical Properties and Biological Behavior. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **2022**, *33* (3), 31. <https://doi.org/10.1007/s10856-022-06653-8>.

- (25) Joseph, B.; James, J.; Grohens, Y.; Kalarikkal, N.; Thomas, S. Additive Manufacturing of Poly (ϵ -Caprolactone) for Tissue Engineering. *JOM* **2020**, *72* (11), 4127–4138. <https://doi.org/10.1007/s11837-020-04382-3>.
- (26) Kim, M. H.; Yun, C.; Chalisserry, E. P.; Lee, Y. W.; Kang, H. W.; Park, S.-H.; Jung, W.-K.; Oh, J.; Nam, S. Y. Quantitative Analysis of the Role of Nanohydroxyapatite (nHA) on 3D-Printed PCL/nHA Composite Scaffolds. *Materials Letters* **2018**, *220*, 112–115. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2018.03.025>.
- (27) Agarwal, S.; Speyerer, C. Degradable Blends of Semi-Crystalline and Amorphous Branched Poly(Caprolactone): Effect of Microstructure on Blend Properties. *Polymer* **2010**, *51* (5), 1024–1032. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2010.01.020>.
- (28) Park, J. H.; Tucker, S. J.; Yoon, J.-K.; Kim, Y.; Hollister, S. J. 3D Printing Modality Effect: Distinct Printing Outcomes Dependent on Selective Laser Sintering (SLS) and Melt Extrusion. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2024**, *112* (7), 1015–1024. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.37682>.
- (29) Dias, J. R.; Sousa, A.; Augusto, A.; Bártolo, P. J.; Granja, P. L. Electrospun Polycaprolactone (PCL) Degradation: An In Vitro and In Vivo Study. *Polymers* **2022**, *14* (16). <https://doi.org/10.3390/polym14163397>.
- (30) Wang, F.; Tankus, E. B.; Santarella, F.; Rohr, N.; Sharma, N.; Märtin, S.; Michalscheck, M.; Maintz, M.; Cao, S.; Thieringer, F. M. Fabrication and Characterization of PCL/HA Filament as a 3D Printing Material Using Thermal Extrusion Technology for Bone Tissue Engineering. *Polymers* **2022**, *14* (4). <https://doi.org/10.3390/polym14040669>.
- (31) Gerdes, S.; Mostafavi, A.; Ramesh, S.; Memic, A.; Rivero, I. V.; Rao, P.; Tamayol, A. Process–Structure–Quality Relationships of Three-Dimensional Printed Poly(Caprolactone)-Hydroxyapatite Scaffolds. *Tissue Engineering Part A* **2020**, *26* (5–6), 279–291. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2019.0237>.
- (32) Liu, D.; Nie, W.; Li, D.; Wang, W.; Zheng, L.; Zhang, J.; Zhang, J.; Peng, C.; Mo, X.; He, C. 3D Printed PCL/SrHA Scaffold for Enhanced Bone Regeneration. *Chemical Engineering Journal* **2019**, *362*, 269–279. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.01.015>.
- (33) Weng, L.; Teusink, M. J.; Shuler, F. D.; Parecki, V.; Xie, J. Highly Controlled Coating of Strontium-Doped Hydroxyapatite on Electrospun Poly(ϵ -Caprolactone) Fibers. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* **2017**, *105* (4), 753–763. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33598>.
- (34) Alshemary, A. Z.; Pazarcaviren, A. E.; Tezcaner, A.; Evis, Z. Mesoporous Strontium Doped Nano Sized Sulphate Hydroxyapatite as a Novel Biomaterial for Bone Tissue Applications. *RSC Adv.* **2016**, *6* (72), 68058–68071. <https://doi.org/10.1039/C6RA16809D>.
- (35) Bulina, N. V.; Khvostov, M. V.; Borodulina, I. A.; Makarova, S. V.; Zhukova, N. A.; Tolstikova, T. G. Substituted Hydroxyapatite and β -Tricalcium Phosphate as Osteogenesis Enhancers. *Ceramics International* **2024**. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2024.06.136>.
- (36) Zhou, X.; Wang, Z.; Li, T.; Liu, Z.; Sun, X.; Wang, W.; Chen, L.; He, C. Enhanced Tissue Infiltration and Bone Regeneration through Spatiotemporal Delivery of Bioactive

- Factors from Polyelectrolytes Modified Biomimetic Scaffold. *Materials Today Bio* **2023**, *20*, 100681. <https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2023.100681>.
- (37) Radulescu, D.-E.; Vasile, O. R.; Andronescu, E.; Fikai, A. Latest Research of Doped Hydroxyapatite for Bone Tissue Engineering. *International Journal of Molecular Sciences* **2023**, *24* (17). <https://doi.org/10.3390/ijms241713157>.
- (38) Clark, R. A. F.; Ghosh, K.; Tonnesen, M. G. Tissue Engineering for Cutaneous Wounds. *Journal of Investigative Dermatology* **2007**, *127* (5), 1018–1029. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700715>.
- (39) Sell, S. A.; McClure, M. J.; Garg, K.; Wolfe, P. S.; Bowlin, G. L. Electrospinning of Collagen/Biopolymers for Regenerative Medicine and Cardiovascular Tissue Engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2009**, *61* (12), 1007–1019. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.07.012>.
- (40) Chartrain, N. A.; Williams, C. B.; Whittington, A. R. A Review on Fabricating Tissue Scaffolds Using Vat Photopolymerization. *Acta Biomaterialia* **2018**, *74*, 90–111. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.05.010>.
- (41) Liu, T.; Jin, M.; Zhang, Y.; Weng, W.; Wang, T.; Yang, H.; Zhou, L. K⁺/Sr²⁺/Na⁺ Triple-Doped Hydroxyapatites/GelMA Composite Hydrogel Scaffold for the Repair of Bone Defects. *Ceramics International* **2021**, *47* (21), 30929–30937. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2021.07.277>.
- (42) Chen, Q.; Zou, B.; Wang, X.; Zhou, X.; Yang, G.; Lai, Q.; Zhao, Y. SLA-3d Printed Building and Characteristics of GelMA/HAP Biomaterials with Gradient Porous Structure. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* **2024**, *155*, 106553. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2024.106553>.
- (43) Zeugolis, D. I.; Paul, G. R.; Attenburrow, G. Cross-Linking of Extruded Collagen Fibers—A Biomimetic Three-Dimensional Scaffold for Tissue Engineering Applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2009**, *89A* (4), 895–908. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.32031>.
- (44) Allen, N. B.; Abar, B.; Johnson, L.; Burbano, J.; Danilkowicz, R. M.; Adams, S. B. 3D-Bioprinted GelMA-Gelatin-Hydroxyapatite Osteoblast-Laden Composite Hydrogels for Bone Tissue Engineering. *Bioprinting* **2022**, *26*, e00196. <https://doi.org/10.1016/j.bprint.2022.e00196>.
- (45) Uçak, N.; Çiçek, A.; Aslantas, K. Machinability of 3D Printed Metallic Materials Fabricated by Selective Laser Melting and Electron Beam Melting: A Review. *Journal of Manufacturing Processes* **2022**, *80*, 414–457. <https://doi.org/10.1016/j.jmapro.2022.06.023>.
- (46) Song, Y.; Ghafari, Y.; Asefnejad, A.; Toghraie, D. An Overview of Selective Laser Sintering 3D Printing Technology for Biomedical and Sports Device Applications: Processes, Materials, and Applications. *Optics & Laser Technology* **2024**, *171*, 110459. <https://doi.org/10.1016/j.optlastec.2023.110459>.
- (47) Mancuso, E.; Shah, L.; Jindal, S.; Serenelli, C.; Tsikriteas, Z. M.; Khanbareh, H.; Tirella, A. Additively Manufactured BaTiO₃ Composite Scaffolds: A Novel Strategy for Load Bearing Bone Tissue Engineering Applications. *Materials Science and Engineering: C* **2021**, *126*, 112192. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112192>.

- (48) Rajan, K.; Samykano, M.; Kadirgama, K.; Harun, W. S. W.; Rahman, Md. M. Fused Deposition Modeling: Process, Materials, Parameters, Properties, and Applications. *The International Journal of Advanced Manufacturing Technology* **2022**, *120* (3), 1531–1570. <https://doi.org/10.1007/s00170-022-08860-7>.
- (49) Peltola, S. M.; Melchels, F. P. W.; Grijpma, D. W.; Kellomäki, M. A Review of Rapid Prototyping Techniques for Tissue Engineering Purposes. *Annals of Medicine* **2008**, *40* (4), 268–280. <https://doi.org/10.1080/07853890701881788>.
- (50) Fina, F.; Goyanes, A.; Gaisford, S.; Basit, A. W. Selective Laser Sintering (SLS) 3D Printing of Medicines. *International Journal of Pharmaceutics* **2017**, *529* (1), 285–293. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.06.082>.
- (51) Rane, K.; Strano, M. A Comprehensive Review of Extrusion-Based Additive Manufacturing Processes for Rapid Production of Metallic and Ceramic Parts. *Advances in Manufacturing* **2019**, *7* (2), 155–173. <https://doi.org/10.1007/s40436-019-00253-6>.
- (52) Whyman, S.; Arif, K. M.; Potgieter, J. Design and Development of an Extrusion System for 3D Printing Biopolymer Pellets. *The International Journal of Advanced Manufacturing Technology* **2018**, *96* (9), 3417–3428. <https://doi.org/10.1007/s00170-018-1843-y>.
- (53) Krishnanand; Singh, V.; Mittal, V.; Branwal, A. K.; Taufik, M. Extruder Design in Pellets Operated 3D Printers: A Review. In *Proceedings of the International Conference on Industrial and Manufacturing Systems (CIMS-2020)*; Pratap Singh, R., Tyagi, D. M., Panchal, D., Davim, J. P., Eds.; Springer International Publishing: Cham, 2022; pp 661–675.
- (54) Chen, H.; Guo, L.; Zhu, W.; Li, C. Recent Advances in Multi-Material 3D Printing of Functional Ceramic Devices. *Polymers* **2022**, *14* (21). <https://doi.org/10.3390/polym14214635>.
- (55) Singamneni, S.; Behera, M. P.; Truong, D.; Le Guen, M. J.; Macrae, E.; Pickering, K. Direct Extrusion 3D Printing for a Softer PLA-Based Bio-Polymer Composite in Pellet Form. *Journal of Materials Research and Technology* **2021**, *15*, 936–949. <https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2021.08.044>.
- (56) Liaw, C.-Y.; Guvendiren, M. Current and Emerging Applications of 3D Printing in Medicine. *Biofabrication* **2017**, *9* (2), 024102. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/aa7279>.
- (57) Goodarzi Hosseinabadi, H.; Nieto, D.; Yousefinejad, A.; Fattel, H.; Ionov, L.; Miri, A. K. Ink Material Selection and Optical Design Considerations in DLP 3D Printing. *Applied Materials Today* **2023**, *30*, 101721. <https://doi.org/10.1016/j.apmt.2022.101721>.
- (58) Levato, R.; Dudaryeva, O.; Garciamendez-Mijares, C. E.; Kirkpatrick, B. E.; Rizzo, R.; Schimelman, J.; Anseth, K. S.; Chen, S.; Zenobi-Wong, M.; Zhang, Y. S. Light-Based Vat-Polymerization Bioprinting. *Nature Reviews Methods Primers* **2023**, *3* (1), 47. <https://doi.org/10.1038/s43586-023-00231-0>.
- (59) Gu, Z.; Fu, J.; Lin, H.; He, Y. Development of 3D Bioprinting: From Printing Methods to Biomedical Applications. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* **2020**, *15* (5), 529–557. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2019.11.003>.

- (60) Zhang, Y.; Li, M.; Tseng, T.-M.; Schlichtmann, U. Open-Source Interactive Design Platform for 3D-Printed Microfluidic Devices. *Communications Engineering* **2024**, *3* (1), 71. <https://doi.org/10.1038/s44172-024-00217-0>.
- (61) Haudum, S.; Demirdögen, B.; Müller-Müchler, L.; Döttl, S. C.; Müller, S. M.; Naderer, C.; Brüggemann, O.; Griesser, T.; Jacak, J.; Priglinger, E.; Teasdale, I. Biodegradable Resins for Photochemical 3D Printing via Vinyl Ester and Vinyl Carbonate Functionalized Amino Acid-Phosphoramidates. *European Polymer Journal* **2024**, *211*, 113037. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2024.113037>.