



(12)

## CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2019 00736**

(22) Data de depozit: **13/11/2019**

(41) Data publicării cererii:  
**28/05/2021** BOPI nr. **5/2021**

(71) Solicitant:  
• **INSTITUTUL DE BIOLOGIE ȘI  
PATOLOGIE CELULARĂ "NICOLAE  
SIMIONESCU"**, STR. B.P. HAȘDEU NR. 8,  
SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:  
• **CECOLTAN SERGIU**, ȘOS. OLTEȚIȚEI  
NR. 17J, BL. 7, AP. 13,  
POPEȘTI-LEORDENI, IF, RO;  
• **BUTOI ELENA**, STR. HUEDIN, NR.7, BL.2,  
SC.2, AP.83, ET.3, SECTOR 4,  
BUCUREȘTI, B, RO;  
• **MACARIE RĂZVAN**,  
ALEEA POIANA MARE, NR.6, BL.B8, SC.A,  
AP.3, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;

• **CIORTAN LETIȚIA**,  
STR.VULCAN JUDEȚUL, NR.31-35, BL.B3A,  
SC.2, AP.62, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,  
RO;  
• **VADANA MIHAELA**,  
STR. SILVICULTORULUI, NR.24, TAZLAU,  
NT, RO;  
• **MANDUTEANU ILEANA**,  
STR.GEORGE CĂLINESCU, NR.27, BL.A17,  
SC.A, ET.3, AP.14, SECTOR 1,  
BUCUREȘTI, B, RO

(74) Mandatar:  
**CABINET DE PROPRIETATE  
INDUSTRIALĂ "LAZĂR ELENA"**,  
B-DUL UNIRII, BL. 16C, AP. 12, OP 1, CP 52,  
BUZĂU, JUDEȚUL BUZĂU

## (54) PROCEDEU DE OBTINERE A UNUI MODEL 3D DE FOIȚĂ VALVULARĂ BIOPRINTABILĂ

(57) Rezumat:

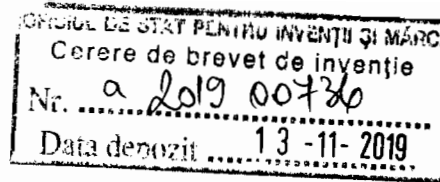
Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui model tridimensional bioprintat de foiță valvulară folosind bioimprimanta utilizat pentru studiul calcifierii valvei aortice *in vitro*. Procedeu, conform invenției, constă în etapele de: preparare a unui amestec de suspensie de celule valvulare interstițiale (VIC), izolate din valve umane, la o densitate de  $2 \times 10^6$  celule/ml, cu un gel preparat în prealabil din gelatină porcină, anhidridă metacrilică, antibiotic, soluție de alginat de sodiu și fotoinițiator, încărcarea amestecului în seringă bioimprimantei, bioprintarea constructului 3D, urmată de fotopolimerizarea hidrogelului, transferul constructului reticulat în mediu de cultură uzual pentru culturi

celulare timp de 24 h la temperatura de  $37^\circ\text{C}$ , însămănțarea la exterior a celulelor endoteliale valvulare (VEC), izolate din valve umane, la o densitate de  $8 \times 10^4$  celule/cmp și menținerea în incubatorul de culturi celulare la  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ , timp de 48 h, rezultând un strat confluent de celule VEC la suprafața constructului 3D și formarea unei rețele celulare interne de celule VIC la interior, modelul 3D fiind evaluat asupra capacității de a forma centri de calcifiere.

Revendicări: 10  
Figuri: 12

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).





## Procedeu de obținere a unui model 3D de foiță valvulară bioprintabilă

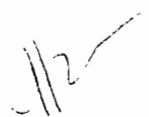
Procedeu de obținere a unui model 3D de foiță valvulară bioprintabilă este destinat domeniului medicinei, pentru studiul bolilor valvei aortice precum și ca model pentru testarea unor agenți terapeutici.

### Descrierea stadiului actual - stadiu actual context științific actual

**a) Structura valvei.** Valva aortică este localizată între aortă și ventriculul stâng asigurând trecerea unidirecțională a sângelui din ventriculul stâng către circulația sistemică. În timpul sistolei, presiunea de la nivelul ventriculului stâng crește, determinând deschiderea valvei aortice, fapt care permite trecerea sângelui. La sfârșitul acestui eveniment, presiunea de la nivelul ventriculului stâng scade brusc iar valva aortică se închide. În Fig. 1 este reprezentată “Valva aortică deschisă (stânga) sau închisă (dreapta)” (sursa [www.healthjade.com](http://www.healthjade.com)). Valva aortică are o structură avasculară cu trei foițe, compusă dintr-un strat exterior de celule valvulare endoteliale (VEC) și trei straturi interne - fibrosa, spongiosa și ventricularis - alcătuite majoritar din celule valvulare interstițiale (VICs) și diferite elemente de matrice extracelulară (**Figura 2**) (sursa - (**Rutkovskiy și colab., 2017**). *Structura simplificată a foiței aortice umane. În partea stângă a Fig 2 este prezentată o secțiune transversală schematică prin foița valvulară aortică ne-coronariană. În dreapta este prezentată organizarea triplu strat a matricei extracelulare cu localizarea celulelor endoteliale valvulare aortice (VEC), care căptușesc țesutul valvular pe ambele părți, și a celulelor valvulare interstițiale (VIC). La nivelul celor trei straturi (fibrosa, spongiosa și ventricularis) sunt prezente celule valvulare interstițiale care secretă molecule de matrice caracteristice fiecărui strat (fibre de colagen, proteoglicani respectiv elastină). Prin compoziția lor, fibrosa, spongiosa și ventricularis asigură rezistență, elasticitate și flexibilitate valvei care este supusă permanent unui stres mecanic. Fibrosa este stratul cel mai gros fiind situat spre partea aortică. Este alcătuită din fibre de colagen de tip I și III, strâns împachetate care asigură rezistență. Spongiosa, stratul din mijloc este alcătuit din proteoglicani iar ventricularis, din fibre de elastină care asigură elasticitatea valvei, necesară închiderii și deschiderii acesteia (Leopold, 2012). Funcția valvei aortice este determinată de cele două tipuri celulare majoritare, situate la nivelul acestei structuri: celulele endoteliale valvulare (VEC) și celulele interstițiale valvulare (VIC). VEC-urile constituie o barieră între fluxul sangvin și țesutul valvular. Celulele VIC sunt numeroase, heterogene și se dispun la nivelul tuturor celor trei straturi ale valvei aortice (fibrosa,*

spongiosa, ventricularis). În valva normală aceste tipuri de celule au un fenotip asemănător fibroblastelor: qVIC (quiescent VIC). În condiții normale, interacția VIC-VEC asigură homeostazia de la nivelul valvei aortice și buna funcționalitate a acesteia.

**b) Patologia valvei** - Boala valvei aortice (BVA) are ca rezultat aproximativ 20.000 de decese anual [Lloyd-Jones et al., 2010], fiind cea mai comună dintre bolile valvulare și este caracterizată de îngroșarea și calcificarea valvei aortice [Otto & Prendergast, 2014]. Stenoza aortică reprezintă manifestarea clinică a BVA și are loc atunci când remodelarea țesutului valvular este suficient de severă încât să apară modificări hemodinamice la nivelul valvei aortice. Scleroza aortică este definită ca manifestarea subclinică a BVA, și anume o remodelare patologică asimptomatică a valvei aortice, fără modificări hemodinamice. Scleroza aortică este diagnosticată fie prin ecocardiografie, unde se urmărește îngroșarea valvei aortice, fie prin computer tomograf, unde se vizualizează calcificarea țesutului valvular [Coffey et al, 2014]. La baza dezvoltării stenozei valvulare stau mecanisme complexe care nu sunt pe deplin cunoscute. Astfel, BVA a fost considerată mult timp o boală degenerativă, însă în prezent progresia bolii este văzută ca un proces celular activ care are loc în foițele valvulare aortice. În mare, patofiziologia BVA urmărește un mecanism similar aterosclerozei, care implică mai multe procese patofiziologice interconectate și care culminează cu fibroza, calcificarea și obstrucția hemodinamică. De asemenea, BVA manifestă o stabilitate mai pronunțată a plăcii calcificate comparativ cu boala aterosclerotică, unde plăcile avansate sunt susceptibile rupturii [Otto et al., 1994]. În condiții patologice (expunerea la diverși factori de stres mecanici -hipertensiune -sau biochimici -hiperglicemia, -hipercolesterolemia), are loc atât activarea celulelor endoteliale cât și a VIC-urilor care capătă un fenotip asemănător miofibroblastelor (aVIC). Pe măsură ce boala avansează VIC-urile sunt caracterizate de un fenotip asemănător osteoblastelor (obVIC) și se observă microcalcificări, reprezentate de depozite amorfe de calciu care determină leziunea avansată. Acest fenotip osteoblastic, caracterizat de expresia unor markeri condrogenici și osteogenici: osteopontină, osteonectină, sialoproteina osoasă, fosfataza alcalină, proteinele BMP-2 și BMP-se; este considerat a fi responsabil pentru apariția leziunilor avansate de calciu de la nivelul țesutului valvei aortice [Leopold, 2012]. *Înțelegerea deplină a mecanismelor implicate în evoluția procesului de calcificare ar putea permite identificarea unor molecule cheie care ar putea fi ținte terapeutice în tratamentul bolii valvei aortice [Lerman et al., 2015].*

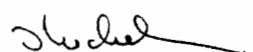

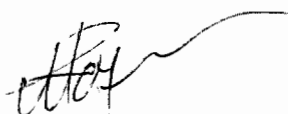
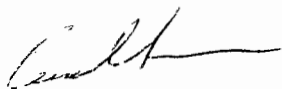


c) **Terapii existente în prezent pentru CAVD.** În ultimii ani există un interes din ce în ce mai crescut pentru ingineria hidrogelurilor în vederea obținerii de țesuturi și de modele 3D pentru studiul diferitelor boli. Motivația majoră este că astfel de hidrogeluri pot imita mai bine micromediul fiziologic al diferitelor țesuturi umane [Mabryet al., 2015]. Mai mult, modele de țesuturi 3D realizate cu celulele proprii ale pacienților pot revoluționa modul de tratament și pot dezvolta alternative de diagnostic. Astfel, regenerarea țesutului valvular este un proces integrat care implică atât celulele cât și elemente de matrice extracelulară. Deși au fost propuse diferite modele 3D pentru valva aortică, cele mai multe dintre ele au fost dezvoltate doar cu VIC-uri, unele dintre ele cu VEC-uri / VIC-uri de origine porcină sau ovină, **dar niciunul din modele 3D existente până în prezent nu include ambele tipuri de celule valvulare umane (VEC și VIC).** Studii recente de inginerie a foii valvulare în scopul studierii fenotipului VIC au folosit materiale diverse, cum ar fi: hidrogeluri de hialuronan [Puperi et al., 2016] și hidrogeluri sintetice pe bază de polietilen glicol PEG [Mabryet al., 2015; Puperi et al., 2015]. VIC cultivate în materiale derivate din polimeri naturali, cum ar fi colagenul și fibrina, au prezentat viabilitate ridicată; totuși aceste materialele nu sunt ideale pentru dezvoltarea de hidrogeluri datorită susceptibilității lor la degradare și compactare [Walker et al., 2004]. Pe de altă parte, gelatina metacrilată (GelMA) și acidul hialuronic metacrilat (HAMA) au fost utilizate cu succes ca modele care pot fi reticulate și în care pot fi incluse celulele VIC [Eslami et al., 2015; Hjortnaes, J. et al. 2015; Duan et al. 2013]. Bioprintarea 3D oferă atât o cultivare și o atașare celulară superioară în comparație cu tehnicile tradiționale de obținere a diferitelor matrici, cât și o variabilitate mai mică de la gel la gel – o reproductibilitate crescută (cu un randament mare) [Murphy & Atala, 2014; van der Ven et al., 2017]. Tehnica de bioprintare 3D a fost deja utilizată pentru fabricarea de țesuturi complexe *in vitro* (de exemplu, modele de tumori co-cultură, ramificații vasculare și structuri cartilajinoase cum ar fi urechile și traheea [Norotte et al., 2009; Flores et al., 2017; Bhora et al., 2017] și este compatibilă cu hidrogelurile pe bază de gelatină metacrilată [Levato et al., 2017]. Într-un model bioprintat de valvă descris recent, autorii au încercat să redea biomecanica foii valvulare prin încercarea de a separa prin microdisecție straturile foii valvulare. Astfel, în modelul propus de ei, hidrogelul obținut din gelatină metacrilată GelMA/acid hialuronic metacrilat MeHA, a fost turnat în strat unic sau din 2 straturi într-o matriță bioprintată în prealabil din gel pluronic [van der Valk et al., 2018]. Acest model are doar VIC-uri încapsulate în hidrogel, dar nu și celule endoteliale la suprafață, așa cum prezintă foia valvulară umană. Odata cu îmbunătățirea

performanței și rezoluției bioprintării și a materialelor disponibile, printarea 3D a devenit un instrument util în diferite domenii, inclusiv medicina [Paul et al., 2019]. Bioprintarea țesuturilor profită de tehnologia de printare 3D pentru a produce biomateriale cu celule incluse individual sau în tandem, strat cu strat, creând direct structuri de țesut tridimensional. Deși progresele medicale înregistrate în domeniul bioprintării 3D sunt deja semnificative și interesante, pentru unele dintre aplicațiile mai revoluționare, cum ar fi imprimarea de organe, mai este nevoie de timp pentru a evolua și a putea fi implementate. Datorită lipsei de vasculatură, bioprintarea valvei pare un deziderat care poate fi atins.

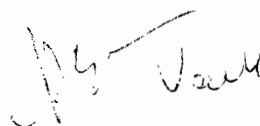
**Problema tehnică** pe care o rezolvă invenția prezentă este dezvoltarea unui construct 3D cu celule valvulare umane și un hidrogel realizat din gelatină metacrilată și alginat, cu VIC-uri încapsulate în hidrogel și VEC-uri cultivate la suprafață. Invenția rezolvă posibilitatea de generare *in vitro* printr-un procedeu netoxic, a unui model tridimensional de foiță valvulară, folosind bioimprimanta, de asemenea este posibil co-cultivarea în același hidrogel/bioink a celor două tipuri de celule valvulare umane dispuse similar structurii foiței valvulare aortice. Astfel, conform invenției s-a dezvoltat un prototip de foiță de valvă aortică prin includerea celulelor umane VEC, VIC într-un hidrogel biocompatibil, în dorința de a crea un construct 3D care să imite structura foiței valvulare umane, pentru testarea/dezvoltarea unor agenți terapeutici noi sau deja existenți. Procedul permite studierea interacțiunii celulare între tipurile celulare existente în foița valvulară umană, în condiții *in vitro*, diminuând folosirea/costurile necesare unor studii efectuate pe modele *in vivo*, oferind totodată condiții de răspuns celular similare cu acestea. De asemenea modelul oferă posibilitatea de a studia efectele diferiților agoniști care induc disfuncția foițelor valvulare (glucoză crescută, LPS, TNF, etc.) și calcifierea valvei prin expunerea la medii speciale care să simuleze condițiile de calcifiere. Modelul de foiță valvulară poate fi folosit în viitor în studiul terapiilor de contracarare a efectelor diferiților agoniști care induc disfuncția și calcificarea valvei.

**Procedeu de obținere a unui model 3D de foiță valvulară bioprintabilă înlătură dezavantajele soluțiilor** cunoscute și rezolvă problema tehnică astfel: pe suprafața unui model 3D sunt poziționate în monostrat celule VEC și în tot volumul sunt distribuite sub forma de rețea, celulele VIC printr-o succesiune de etape care încep cu selectarea materialelor, urmează o serie de etape pentru obținerea și caracterizarea celulelor valvulare umane utilizate, care încep cu izolarea celulelor VEC și VIC din valve umane, VIC-urile izolate din valve umane prezintă markerii de celule mezenchimale vimentină și  $\alpha$ -SMA iar VEC-urile prezintă markerul endotelial von



Wilebrand factor (vWF). Urmează etape pentru obținerea hidrogelului GP-1 necesar realizării unui model bioprintabil, model care se conturează inițial prin realizarea unui desen tri-dimensional cu ajutorul unui program software și care va transmite informația la o bioimprimantă, prevăzută cu 4 capete de printare diferite. În final, modelul bioprintabil are o formă de disc cu diametrul de 14mm și o înălțime de aproximativ 1 mm, realizat din 3-4 straturi de hidrogel, fiecare strat fiind proiectat ca o serie de rânduri orizontale sau verticale, constructul formează un grilaj cu ochiuri pentru o mai bună infiltrație a mediului de cultură, dimensiunea modelului a fost limitată de utilizarea unor plăci de cultură standard, de 24 de godeuri. În etapele de realizare a modelului 3D de foiță valvulară un amestec de suspensie celulară de VIC la o densitate de  $2 \cdot 10^6$  ( $1 - 10 \cdot 10^6$ ) celule/ml se amestecă cu GP-1, și se încarcă în seringă bioimprimantei, urmând printarea și o etapă de foto-polimerizare a hidrogenului. După reticulare construcții 3D sunt transferați în mediu de cultură DMEM 1% glucoză (1 – 4.5 % glucoză) + 10% (1-20%) ser fetal bovin + antibiotice și incubați timp de 24h la 37°C; mediul de cultură este reînnoit după 24 de ore pentru a înlătura resturile celulare și alginatul de sodiu, peste constructul 3D cu celule VIC încapsulate în interior sunt însămânțate celule VEC la exterior, la o densitate  $8 \cdot 10^4$  de celule/cm<sup>2</sup> ( $5-10 \cdot 10^4$  celule/cm<sup>2</sup>) și modelul 3D, este menținut în incubatorul de culturi celulare la 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. După 48 de ore de la însămânțarea celulelor endoteliale se observă un strat confluent de celule VEC la suprafața modelului 3D și formarea unei rețele celulare interne de celulele VIC în interior. Urmează o serie de etape de caracterizare și analiză a celulelor în modelul 3D de foiță valvulară bioprintabilă. Ultimele etape fiind cele de evaluare a capacității modelului 3D de foiță valvulară de a forma centrul de calcificare pentru posibilitatea studiului calcificării valvei aortice *in vitro* pe acest model.

Materialele necesare, selectate sunt din categoria: alginat de sodiu din alge brune cu vâscozitate medie 15-25cps, 2% (25 °C); gelatină porcină de tip A - derivată după hidroliza acidă a pielii de porc, având vâscozitatea de aproximativ 300, conform test Bloom, masă moleculară de aprox. 75000-100000Da; amestec de colagenaze: izoformele I și II din *Clostridium histolyticum* și de Dispaza - protează neutră obținută din *Bacillus polymyxa* – Liberase; soluție tampon fosfat de sodiu salin 1x (PBS: 137mM clorură de sodiu, 2.7mM clorură de potasiu, 10mM fosfat disodic, 1.8mM fosfat de potasiu monobazic, pH 7.2 - 7.4 la temp. 25°C; anhidridă metacrilică 94-98%; antibiotic: penicilină, streptomycină și amfotericina B; soluție de 100x - 10.000U/ml penicilină și 10mg/ml streptomycină, amfotericină B 25μg/ml; sac pentru dializă din celuloză cu pori de 10.000-14.000kDa; fotoinițiator Irgacure2959 - 2-Hidroxi-4'-(2-hidroxi-etoxi)-2-metilpropiofenonă;



mediu de cultură DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium 1 mg/ml glucoză (1 – 4.5 ‰), suplimentat cu SFV- ser fetal bovin 10% (1-20%); consumabilele sterile pentru culturi celulare.

Pentru întreținerea culturilor celulare și a constructului bioprintat se utilizează un incubator cu umidificare și o concentrație de 5% a CO<sub>2</sub> și o hotă de flux laminar pentru lucrul în condiții aseptice iar pentru pregătirea hidrogelului se utilizează o plită termostatăă cu agitare magnetică.

Pentru izolarea VEC, foițele de valvă aortică sunt spălate cu PBS steril, rece, apoi sunt supuse reacției de digestie enzimatică în colagenază 600U/ml (400-800U/ml) pentru 5' în incubator, la 37°C. Suspensia celulară rezultată este centrifugată pentru 7', 1050 rpm, 24°C, sedimentul rezultat este cultivat pe plăci de cultură tip Petri acoperite cu gelatina porcină 1% în mediu EGM-2, mediu special pentru cultivarea celulelor endoteliale, care conține heparină și factori de creștere, de tip FGF, VEGF, IGF, EGF, cu 20% (1-20%) ser fetal bovin și antibiotice penicilină 100U/ml și streptomycină 100μg/ml; operațiunea se repetă de 2 ori pentru extragerea a cât mai multe VEC, celulele sunt monitorizate și mediul este schimbat o dată la două zile.

Pentru izolarea VIC, foița valvulară este în continuare supusă digestiei enzimatice cu 520U/ml de Liberaza, pentru un timp mai îndelungat, suspensia rezultată după 4-5 ore de digestie, este centrifugată pentru 7', 300g, 24°C; iar sedimentul celular obținut este cultivat în plăci Petri în DMEM cu 20% (1-20%) ser fetal bovin și antibiotice penicilină 100U/ml și streptomycină 100μg/ml. Digestia enzimatică a țesutului rămas este continuată peste noapte în Liberaza, urmând însămânțarea celulelor obținute în DMEM 1‰ + 20% ser fetal bovin, în ultima etapa, țesutul rămas este supus digestiei enzimatice cu Liberază, celulele recoltate sunt însămânțate în plăci Petri în DMEM 1‰ cu 20% ser fetal bovin, schimbarea de mediu pentru VIC izolate are loc o dată la 2 zile.


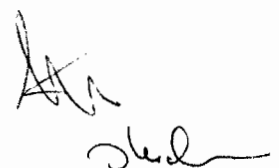

Pentru a obține hidrogelul GP-1 este folosit un protocol adaptat; astfel, gelatina porcină (GP) este dizolvată în tampon fosfat pH 9-9.2 la 40°C la o concentrație finală de 10% (4-20%); peste soluția obținută este adăugată anhidridă metacrilică de 94% în raport 0.04ml:1g gelatină, adăugarea se face lent cu picătura și agitare magnetică continuă, reacția de substituție se realizează timp de 1 oră la temperatura de 45°C pe agitator, inactivarea reacției se face prin scăderea pH-ului până la pH4.5 adăugând 3ml de HCl 1M la 50ml de soluție amestec, după inactivarea soluției de gelatină metacrilată este adăugat antibiotic la o concentrație finală de 500U/ml penicilină, 500μg/ml streptomycină, 12.5μg/ml amfotericină B, amestecul este incubat timp de 30min la 37°C și soluția obținută este transferată în saci de dializă sterili. Gelatina este dializată timp de 7 zile la

*[Handwritten signatures and initials]*

37°C, în apă, protejată de lumină și cu schimbarea apei de cel puțin 3 ori pe zi. După dializă, gelatina este filtrată steril și păstrată la -80°C până la liofilizare, care se realizează timp de 48 ore la presiunea de 0.040 mbar și temperatura de -40°C. Gelatina liofilizată este dizolvată în PBS 1x, pH 7.4 la o concentrație de 10% m/v și este adăugată soluția de alginat de sodiu la o concentrație finală de 1%, omogenizarea se realizează timp de 1h pe plita magnetică termostată la 37°C, fotoinițiatorul Irgacure 2959, preparat proaspăt înainte de folosire, este dizolvat în alcool etilic absolut cu concentrația finală de 10%, și este folosit în raport de 0.1%:1g gelatină metacrilată, amestecarea se realizează timp de 30 de minute cu agitare continuă până la omogenizarea completă a acestuia.

Hidrogelul GP-1 este amestecat cu o suspensie celulară de VIC la o densitate de  $2 \cdot 10^6$  ( $1 - 10 \cdot 10^6$ ) celule/ml, pentru a nu interfera cu fotopolimerizarea, este folosit mediu fără fenol red, amestecul de VIC și GP1 este încărcat în seringă bioimprimantei. După realizarea modelului tridimensional prin extruderea pneumatică sau depunerea în picătură, urmează etapa de fotopolimerizare a hidrogelului, care este realizată cu ajutorul lămpii UV LED încorporate în bioimprimantă, hidrogelul a fost expus timp de 60 secunde la o radiație UV cu lungimea de undă de 365nm și o putere de 280-300 mWatt/cm<sup>2</sup>. Fotoinițiatorul Irgacure este stimulat de radiația UV și inițiază reacția de înrețelare a gelatinei cu formarea de grupări metacrilolil. După reticulare, construcții 3D sunt transferați în mediu de cultură DMEM 1%o glucoză (1 – 4.5 %o glucoză) + 10% (1-20%) ser fetal bovin + antibiotice și incubați timp de 24h la 37°C, timp în care alginatul de sodiu este eliberat în mediu conferind gelului o structură poroasă, propice dezvoltării celulare. Mediul de cultură a fost reînnoit după 24 de ore pentru a înlătura resturile celulare și alginatul de sodiu.

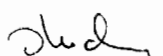
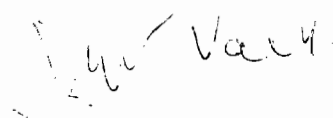
Etapile de caracterizare a celulelor în modelul 3D de foiță valvulară bioprintabilă constată faptul că la 7 zile de la însămânțarea VEC se observă un strat confluent de celule endoteliale valvulare la suprafața modelului 3D și formarea unei rețele de VIC la interior. Pentru vizualizarea filamentelor de actină, și astfel a populării cu celule dar și a morfologiei acestora în modelul 3D de foiță valvulară se realizează fixarea și colorarea construcțiilor cu faloidină-rodamină, pentru asta construcții 3D sunt fixați în PFA 4% (2-8%) pentru 4h la 4°C și permeabilizați cu Triton X-100 0.2% (0.05 -3%) timp de 10' (5'-20'). După această etapă urmează o incubare cu faloidină-rodamină la o concentrație de 120 ng/ml în PBS pentru 40 (20- 60) minute la temperatura camerei, apoi 3 spălări cu PBS pentru îndepărtarea faloidinei-TRITC nelegată, urmează colorarea nucleilor



celulelor cu DAPI, 3x spălări cu PBS și vizualizarea la microscopul de fluorescență, cu ajutorul căruia sunt achiziționate imagini de contrast de fază și fluorescent. VIC-urile încapsulate în gel GP-1 au fenotip alungit, specific și formează o rețea interconectată, evidențiată de filamentele de actină care delimitează forma celulelor - colorația roșie, ceea ce sugerează că VIC-urile sunt compatibile cu hidrogelul GP-1 folosit. VEC însămânțate pe construct proliferază și formează un monostrat pe hidrogel.

Pentru analiza imunohistochimică a modelului 3D de valvă bioprintabilă, construcții sunt incluși în mediu OCT - optimal cutting temperature medium și secționați, după ce sunt menținuți în cultură pentru 14 zile, construcții sunt incubate în soluție 4% (2-8%) PFA - paraformaldehidă preparată în tampon fosfat 0.1 M, pH 7.4 timp de 24h la 4°C, apoi spălați în tampon fosfat 0.1N, urmează crioprotecția în soluții succesive de glicerol: 5%, 15 minute, temperatura camerei; 10%, 1h, 4°C; 20% , peste noapte, 4°C, 50% (1h, 4°C) și stocarea în glicerol 50% la -20°C până la includerea în OCT și secționarea la criotom. În vederea secționării, sunt parcurse următoarele etape: aducerea la 4°C a constructului, 6 spălări a câte 15 minute în soluție 3% sucroză preparată în tampon fosfat 0.1M, includerea în OCT timp de 30 minute, la temperatura camerei și înghețarea rapidă în azot lichid, pentru obținerea secțiunilor de construct pe lame. Blocurile înghețate se montează pe holder cu soluție OCT, din fiecare probă se colectează mai multe secțiuni pe lame SuperFrost, tratate cu poli-L-lizină, la o grosime de 5-7μm, lamele fiind apoi incubate timp de 30 minute la o temperatură de 37°C și păstrate în cutii speciale la -20°C, până la analiza microscopică. Pentru marcarea secțiunilor cu anticorp: lamele cu secțiuni sunt mai întâi aduse la temperatura camerei, timp de 5-10 minute, urmează uscarea secțiunilor la 37°C timp de 1h și fixarea în acetonă rece (-20°C) timp de 5 minute, secțiunile sunt spălate în PBS în atmosferă umedă (3 spălări/5 minute) și incubate în tampon de blocare timp de 30 minute, urmează incubarea în anticorpul primar peste noapte la 4°C în atmosferă umedă, spălarea cu PBS, incubarea în anticorpul secundar cuplat cu florocrom, spălarea secțiunilor de țesut cu PBS și cu apă distilată și includerea în soluție de montare care conține DAPI, pentru marcarea nucleilor. Secțiunile obținute din construcții sunt vizualizate la microscopul inversat de fluorescență, secțiunile obținute sunt examinate pentru a evidenția expresia markerilor specifici pentru celule endoteliale CD31 și vWF, care sunt asociate cu monostratul exterior de VEC de pe constructul 3D, pentru a evidenția celulele valvulare interstițiale din modelul 3D au fost utilizați anticorpi specifici pentru vimentină - marker pentru celulele interstițiale ne-activate și FSP-1, marker pentru celule de tip fibroblast. FSP-1 este



localizat în principal în interiorul constructului, zonă populată de VIC iar vimentina este localizată atât în interior cât și pe marginea constructului tridimensional la 14 zile.

Pentru a testa funcționalitatea constructului 3D obținut pentru calcificarea valvei aortice, acesta a fost expus la stimuli osteogenici – mediu control suplimentat cu 10 mM  $\beta$ -glicerolfosfat, 10 ng/mL acid ascorbic, and  $10^{-8}$ M dexametazonă, timp de 14 zile (14-21 zile), pentru a identifica depozitele de calciu de la nivelul modelului tridimensional de foiță valvulară, s-a realizat colorarea cu Alizarin Red, în acest scop, construcții au fost fixați cu paraformaldehidă (PFA) 4% la 37 °C, timp de 2 ore (1-3 ore), s-au realizat apoi 3 spălări cu PBS, urmate de incubarea construcțiilor cu o soluție de Alizarin Red de concentrație 2% timp de 10 minute ; pentru îndepărtarea excesului de colorant, construcții au fost spălați cu PBS de trei ori; în scopul cuantificării gradului de calcifiere, s-a realizat eliberarea colorantului în mediu prin incubarea construcțiilor timp de 1 oră în acid acetic 10%. Neutralizarea acidului acetic s-a făcut cu o soluție de 10% hidroxid de amoniu (raport 1:1), iar mediul rezultat a fost cuantificat spectrofotometric prin citirea absorbției la 405 nm, valorile acestea fiind direct proporționale cu nivelul depozitelor de calciu din construcți.

Procedeu de obținere a unui model 3D de foiță valvulară bioprintabilă prezintă următoarele avantaje :

1. Modelul de foiță produs conține celule umane valvulare, interstițiale valvulare (VIC) în interior, și endoteliale valvulare la suprafață, asigurând astfel, atât structura stratificată a foiței valvulare aortice cât și comunicarea intercelulară care are loc în valvele native.
2. Oferă un răspuns celular *in vitro* similar cu cel din valva umană dar și un răspuns asemănător celui patologic atunci când este expus de exemplu condițiilor osteogenice.
3. Modelul propus poate fi bioprintat, folosind o imprimantă 3D dotată cu extruder, sau turnat în matrice/vas cu forma predefinită.
4. Se poate realiza și din alte tipuri de bioink-uri (dezvoltate în laborator sau comerciale) și care pot prezenta variante diferite de reticulare: reticulare ionică, covalentă inițiată prin expunere la UV-Vis, auto-asamblabile sau reticulate enzimatic.
5. Această invenție prezintă potențial pentru a fi implementată și aplicată în: dezvoltarea de terapii țintite pentru calcificarea valvei aortice; verificarea unor compuși activi existenți cu potențial farmacologic; obținerea unui model 3D *in vitro* pentru studii de medicină regenerativă cu aplicații în transplantul de valvă, eliminarea parțială a numărului mare de modele *in vivo* folosite în studii și în dezvoltarea terapiilor în bolile valvei aortice.



Se dă în continuare un exemplu de realizare al invenției în legătură cu figurile 1- 12, care reprezintă:

**Figura 1.** Valva aortică deschisă (stângă) sau închisă (dreapta)

**Figura 2.** Structură simplificată a foiței aortice umane. În stânga este prezentată o secțiune transversală schematică prin foița valvulară aortică necoronară. În dreapta este prezentată organizarea triplu strat a matricei extracelulare cu localizarea celulelor endoteliale valvulare aortice (VEC), care căptușesc țesutul valvular pe ambele părți, și a celulelor valvulare interstițiale (VIC). La nivelul celor trei straturi (fibrosa, spongiosa și ventricularis) sunt prezente celule valvulare interstițiale care secretă molecule de matrice caracteristice fiecărui strat (fibre de colegen, proteoglicani respectiv elastină).

**Figura 3.** Imagine de microscopie (contrast de fază) a celulelor endoteliale valvulare umane izolate din valvă și multiplicată în cultură (imagini achiziționate la diferite mărituri: A - 4x, B - 10x și C -40x).

**Figura 4.** Imagine de microscopie (contrast de fază) a celulelor interstițiale valvulare umane izolate din valvă și multiplicată în cultură (imagini achiziționate la diferite mărituri: A - 4x, B - 20x și C - 40x).

**Figura 5.** Imagini de microscopie de fluorescență -stânga și contrast de fază -dreapta, a VIC marcate cu vimentină (A) și  $\alpha$ -SMA (B) și a VEC marcate cu vWF (C); imagini preluate la mărirea 40x.

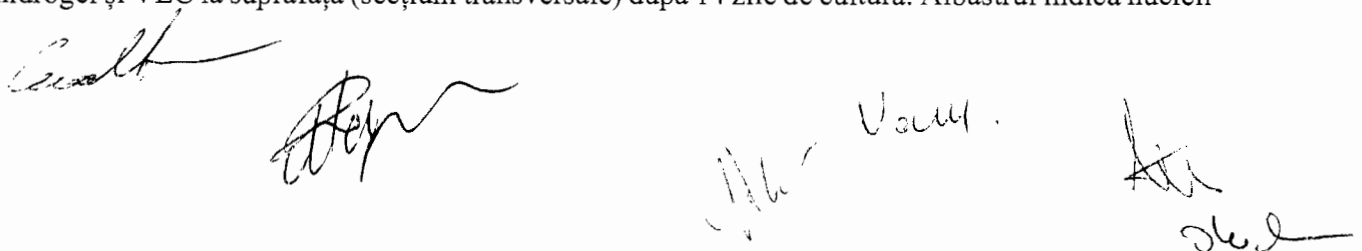
**Figura 6.** Design-ul construcțiilor în BioCAD.

**Figura 7.** Codul G și interfața de lucru a bioimprimantei 3D Discovery

**Figura 8.** A - Schema procedurii de obținere a modelului 3D de foiță valvulară bioprintabilă.

**Figura 9.** Morfologia VIC și VEC în modelul 3D de valvă aortică. A și B – celule endoteliale valvulare pe modelul 3D bioprintabil de valvă aortică, imagini de microscopie în contrast de fază (mărire 10x și 40x). C – celule interstițiale valvulare în interiorul modelului 3D bioprintabil de valvă aortică, imagine de microscopie în contrast de fază (mărire 10x). D și E – Morfologia VEC (D) și VIC (E) observată prin colorare cu faloidină pentru evidențierea filamentelor de actină (roșu), colorarea cu DAPI pentru evidențierea nucleilor (albastru).

**Figura 10.** Markerii specifici pentru VIC și VEC în modelul 3D de valvă aortică. Imagini de imunofluorescență pentru markerii de VEC (A) și VIC (B) în construcții 3D cu VIC încapsulate în hidrogel și VEC la suprafață (secțiuni transversale) după 14 zile de cultură. Albastrul indică nucleii



Several handwritten signatures and initials are present at the bottom of the page, including a large signature on the left, a signature in the center, and several smaller initials on the right.

colorație cu DAPI, roșu indică CD31, verde indică FSP-1, vimentina și vWF după cum este precizat lângă imagini. Controlul cu Alexa și FITC reprezintă secțiuni incubate doar cu anticorpul secundar fluorescent. Bara de scală reprezintă 200 μm.

**Figura 11.** Viabilitatea celulelor în modelul 3D de valvă aortică bioprintabilă. Procentul (%) de celule vii cuantificat prin testul de citotoxicitate Live/Dead după 7, 14 și 21 de zile de cultură. Simbolurile \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  indică o creștere semnificativă a numărului de celule la 14 și 21 de zile comparativ cu 7 zile.

**Figura 12.** Mediul osteogenic activează VIC în construcții 3D. Colorația cu Alizarin Red a fost folosită pentru a evidenția centrul de calcificare format de celule fie în construcții cu VIC la interior și VEC la exterior (v-v), fie în construcții doar cu VIC încapsulate în interior, după 14 zile de cultură. În imaginile de jos se observă câte un construct reprezentativ din fiecare condiție. Reprezentarea grafică a nivelului absorbției pentru construcții menținute în condiții normale comparativ cu cei menținute în mediu osteogenic.  $N = 3$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

#### **Exemple de realizare a procedurii conform invenției:**

În cele ce urmează sunt date exemple concrete care arată cum poate fi implementată și aplicată invenția astfel:

Intr-o prima etapă este necesar a se stabili materialele și echipamentele necesare procedurii.

#### **1) Materiale și echipamente folosite pentru obținerea invenției**

##### **Materiale**

- alginat de sodiu din alge brune cu vâscozitate medie 15-25cps, 2% (25°C) (Sigma, cod nr. W-201502);
- gelatină porcină de tip A - derivată după hidroliza acidă a pielii de porc, având vâscozitatea de aproximativ 300, conform test Bloom, masă moleculară de aprox. 75.000-100.000Da (Sigma, cod nr. G-1890);
- amestec de collagenaze izoformele I și II din Clostridium histolyticum și de Dispaza- proteaza neutră obținută din Bacillus polymyxa – Liberase, (Sigma, cod nr. 05 401 054 001);
- soluție tampon fosfat de sodiu salin 1x (PBS: 137mM clorură de sodiu, 2.7mM clorură de potasiu, 10mM fosfat disodic, 1.8mM fosfat de potasiu monobazic) pH 7.2 - 7.4 la temp. 25°C;
- anhidridă metacrilică 94-98% (Sigma, cod nr. 276685);
- antibiotic: penicilină, streptomicină și amfotericină B; soluție de 100x - 10.000U/ml penicilină și 10mg/ml streptomicină, Amfotericină B 25μg/ml (Gibco, cod nr.15240062);

Valu

- sac pentru dializă din celuloză cu pori de 10.000-14.000kDa;
- fotoinițiator Irgacure2959 - 2-Hidroxi-4'-(2-hidroxi-etoxi)-2-metilpropiofenonă (Sigma, cod nr.410896);
- Liberaza (Liberase DH Research Grade nr de catalog: 05 401 054 001);
- mediu de cultură DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium 1 mg/ml glucoză (Gibco, cat nr. 11885084) suplimentat cu SFV- ser fetal bovin 10% (Gibco, cat nr.10270);
- consumabile sterile pentru culturi celulare;

### **Echipe folosite**

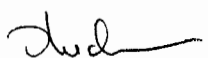
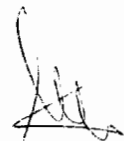
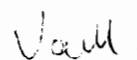
Pentru bio-printarea modelului 3D de foiță valvulară a fost folosită bioimprimanta 3D Discovery de la RegenHU. Pentru întreținerea culturilor celulare și a constructului bioprintat a fost utilizat un incubator - Thermo scientific cu umidificare și o concentrație a CO<sub>2</sub> de 5% și o hotă de flux laminar pentru lucru în condiții aseptice. Pentru pregătirea hidrogelului a fost utilizată o plită termostatăă cu agitare magnetică.

### **2) Într-o succesiune de etape de început ale procedurii are loc obținerea și caracterizarea celulelor valvulare umane utilizate în modelul de foiță valvulară**

Celulele valvulare umane au fost izolate din valve umane (obținute în urma intervențiilor chirurgicale). Toate materialele necesare izolării de celule au fost sterilizate în prealabil.

Pentru izolarea VEC, foițele de valvă aortică au fost spălate cu PBS steril, rece apoi supuse reacției de digestie enzimatică în collagenază 600U/ml (400-800U/ml) pentru 5' în incubator, la 37°C. Suspensia celulară rezultată a fost centrifugată pentru 7', 1050 rpm, 24°C. Sedimentul rezultat a fost cultivat pe plăci de cultură tip Petri acoperite cu gelatină porcină 1% în mediu EGM-2 (Lonza, cod. nr. CC-4176; mediu special pentru cultivarea celulelor endoteliale, care conține heparină și factori de creștere, cum ar fi: FGF, VEGF, IGF, EGF) cu 20% (10-20%) ser fetal bovin și antibiotice penicilină 100U/ml și streptomycină 100μg/ml. Operațiunea se repetă de 2 ori pentru extragerea a cât mai multe VEC. Celulele au fost monitorizate și mediul a fost schimbat o dată la două zile. VEC-urile la pasajul 4-7 au folosite în modelul 3D (Figura 3).

Pentru izolarea VIC, foița valvulară a fost în continuare supusă digestiei enzimatice cu 520U/ml de Liberaza (Liberase DH Research Grade nr de catalog: 05 401 054 001), pentru un timp mai îndelungat. Suspensia rezultată după 4-5 ore de digestie, a fost centrifugată pentru 7', 300g, 24°C; iar sedimentul celular obținut a fost cultivat în plăci Petri în DMEM cu 20% (10-20%) ser fetal bovin și antibiotice penicilină 100U/ml și streptomycină 100μg/ml.



Digestia enzimatică a țesutului rămas, a fost continuată peste noapte cu Liberază, urmând însămânțarea celulelor obținute în DMEM 1% + 20% ser fetal bovin. Celulele recoltate au fost însămânțate în plăci Petri în DMEM 1% cu 20% ser fetal bovin. Schimbarea de mediu pentru VIC izolate a avut loc o dată la 2 zile (Figura 4).

Fenotipul acestor celule a fost analizat și confirmat prin microscopie de fluorescență. Rezultatele obținute arată că VIC-urile izolate din valve umane prezintă markerii de celule mezenchimale vimentină și  $\alpha$ -SMA (Figura 5 A și B) iar VEC-urile prezintă markerul endotelial von Willebrand factor (vWF) (Figura 5 C).

### **3) Urmează o altă serie de etape în vederea obținerii hidrogelului GP-1 necesar modelului bioprintabil**

Pentru a obține hidrogelul GP-1 a fost folosit un protocol adaptat (după Lee et al., 2016). Astfel, gelatina porcină (GP) a fost dizolvată în tampon fosfat pH 9-9.2 la 40°C la o concentrație finală de 10% (4-20%). Peste soluția obținută a fost adăugată anhidridă metacrilică de 94% în raport 0.04ml:1g gelatină. Adăugarea s-a făcut lent cu picătura și agitare magnetică continuă. Reacția de substituție s-a realizat timp de 1 oră la temperatura de 45°C pe agitator. Inactivarea reacției s-a efectuat prin scăderea pH-ului până la pH4.5 adăugând 3ml de HCl 1M la 50ml de soluție amestec. După inactivarea soluției de gelatină metacrilată a fost adăugat antibiotic la o concentrație finală de 500U/ml penicilină, 500 $\mu$ g/ml streptomycină, 12.5 $\mu$ g/ml amfotericină B. Amestecul a fost incubat timp de 30min la 37°C și soluția obținută a fost transferată în saci de dializă sterili.

Gelatina a fost dializată timp de 7 zile la 37°C în apă, protejată de lumină și cu schimbarea apei de cel puțin 3 ori pe zi. După dializă, gelatina a fost filtrată steril și păstrată la -80°C până la liofilizare. Liofilizarea s-a realizat timp de 48 ore la presiunea de 0.040 mbar și temperatura de -40°C.

Gelatina liofilizată a fost dizolvată în PBS 1x, pH 7.4 la o concentrație de 10% m/v și a fost adăugată soluția de Alginat de sodiu la o concentrație finală de 1%; omogenizarea s-a realizat timp de 1h pe plită magnetică termostată la 37°C.

Fotoinițiatorul Irgacure 2959, preparat proaspăt înainte de folosire, a fost dizolvat în alcool etilic absolut cu concentrația finală de 10%, și a fost folosit în raport de 0.1%:1g gelatină metacrilată. Amestecarea s-a realizat timp de 30 de minute cu agitare continuă până la omogenizarea completă a acestuia.

### **4) Procedeu implică realizarea unui design al modelului bioprintabil în BioCAD**

The bottom of the page contains several handwritten signatures and initials in black ink. From left to right, there is a large signature, a smaller signature, the word 'Vall', and two more signatures, one of which appears to be 'Luc'.

Pentru realizarea modelului 3D bioprintat s-a folosit bio-imprimanta 3DDiscovery de la RegenHU. Aceasta bioimprimantă este construită pentru cercetare și dezvoltare și prezintă 4 capete de printare diferite folosind fie printarea prin extruzie pneumatică, fie în picătură cu ajutorul unei duze care prezintă o microvalvă. Pentru a funcționa este necesară introducerea unui cod G care determină mișcarea capului de printare. Desenul modelului bioprintabil și generarea codului G s-a realizat cu ajutorul pachetului software BioCAD realizat de producătorii bioimprimantei.

Modelul bioprintabil final a avut o formă de disc cu diametrul de 14mm și o înălțime de aproximativ 1 mm, realizat din 3-4 straturi de hidrogel în funcție de diametrul seringilor de printare (în cazul printării prin extruzie) sau de frecvența picăturilor (în cazul utilizării duzelor cu valvă de deschidere). Fiecare strat a fost proiectat ca o serie de rânduri orizontale sau verticale, constructul formând un grilaj cu ochiuri pentru o mai bună infiltrare a mediu de cultură (Figura 6). Dimensiunea modelului a fost limitată de utilizarea unor plăci de cultură standard, de 24 de godeuri, însă aceasta poate fi modificată în funcție de aplicațiile specifice.

Odată realizat desenul tri-dimensional cu ajutorul BioCAD acesta a fost transformat în cod G pentru a putea fi utilizat de bioimprimantă (Figura 7).

**5) Urmează cele mai importante etape ale procedurii de obținere a modelului 3D de foiță valvulară pentru dezvoltarea de strategii terapeutice.**

Hidrogelul GP-1 a fost amestecat cu suspensia celulară de VIC la o densitate de  $2 \cdot 10^6$  celule/ml. Pentru a nu interfera cu fotopolimerizarea, s-a folosit mediu fără fenol red. Amestecul de VIC și GP1 a fost încărcat în seringă bioimprimantei. Printarea s-a realizat la o viteză de 1000mm/min la o presiune optimă de curgere. După realizarea modelului tridimensional prin extruderea pneumatică sau depunerea în picătură, a urmat etapa de fotopolimerizare a hidrogelului.

Aceasta fotopolimerizare a fost realizată cu ajutorul lămpii UV LED încorporate în bioimprimanta 3D Discovery. Hidrogelul a fost expus timp de 60 secunde la o radiație UV cu lungimea de undă de 365nm și o putere de 280-300mWatt/cm<sup>2</sup>, parametrii demonstrați anterior că nu afectează celulele. Fotoinițiatorul Irgacure este stimulat de radiația UV și inițiază reacția de înrețelare a gelatinei cu formarea de grupări metacrilolil.

După reticulare construcții 3D au fost transferați în mediu de cultură DMEM 1% glucoză (1 – 4.5 % glucoză) + 10% (1-20%) ser fetal bovin + antibiotice și incubați timp de 24h la 37°C. Timp de 24 de ore alginatul de sodiu este eliberat în mediu (acesta nerealizând legături covalente cu gelatina

metacrilată) conferind gelului o structură poroasă, propice dezvoltării celulare. Mediul de cultură a fost reînnoit după 24 de ore pentru a înlătura resturile celulare și alginatul de sodiu.

Peste constructul 3D cu celule VIC încapsulate în interior au fost însămânțate celule VEC la exterior, la o densitate de  $8 \cdot 10^4$  de celule/cm<sup>2</sup> ( $5-10 \cdot 10^4$  celule/cm<sup>2</sup>) și modelul 3D a fost menținut în incubatorul de culturi celulare la 37°C, 5% CO<sub>2</sub> (Figura 8). După 48 de ore de la însămânțarea celulelor endoteliale se observă un strat confluent de celule VEC la suprafața modelului 3D și formarea unei rețele celulare de VIC la interior. VIC la o densitate de  $2 \cdot 10^6$  celule/mL au fost amestecate cu hidrogelul GP-1 (10% gelatină porcină metacrilată, 1% alginat și 0,5% foto-inițiator Irgacure). Bioprintarea și reticularea construcțiilor prin expunere la UV timp de 1 minut utilizând bioimprimanta 3D Discovery (RegenHu). După 24 de ore VEC ( $5 \cdot 10^5$ /cm<sup>2</sup>) au fost însămânțate pe construcții. B – Aspect macroscopic al construcțiilor după bioprintare și incubare în mediu de cultură.

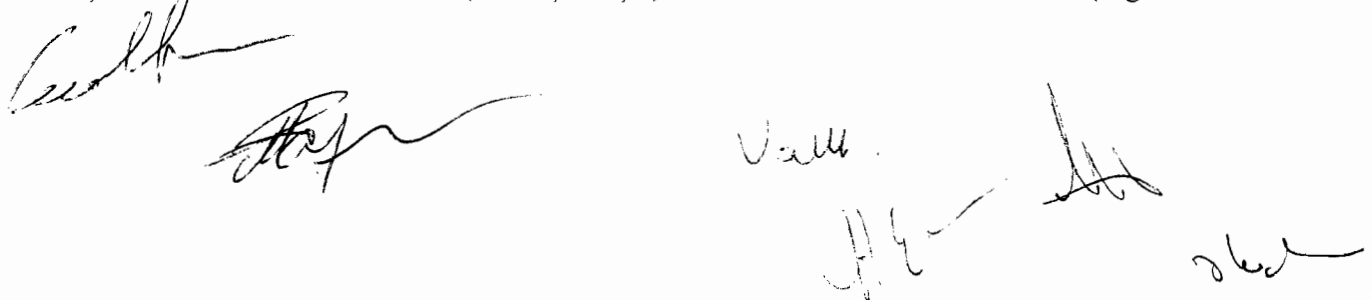
**6) O altă serie de etape sunt cele de caracterizare a celulelor în modelul 3D de foiță valvulară bioprintabilă**

**a. Morfologia celulelor valvulare umane în modelul 3D**

La 7 zile de la însămânțarea VEC s-a putut observa un strat confluent de celule endoteliale valvulare la suprafața modelului 3D și formarea unei rețele celulare interne de celule VIC la interior (Figura 9 - A, B, C).

În vederea vizualizării filamentelor de actină, și astfel a populării cu celule dar și a morfologiei celulelor în modelul 3D de foiță valvulară s-a realizat fixarea și colorarea construcțiilor cu faloidină-rodamină. Pentru asta construcții 3D au fost fixați în 4% (2-8%) pentru 4h la 4°C și permeabilizați cu Triton X-100 0.2% (0.05 -3%) timp de 10' (5'-20'). După această etapă a urmat o incubare cu faloidină-rodamină la o concentrație de 120 ng/ml în PBS pentru 40 (20- 60) minute la temperatura camerei, apoi 3 spălări cu PBS pentru îndepărtarea faloidinei-TRITC nelegată. A urmat colorarea nucleilor celulelor cu DAPI, 3x spălări cu PBS și vizualizarea la microscopul de fluorescență Olympus IX. Au fost achiziționate imagini de contrast de fază și fluorescență utilizând filtrul TRITC (roșu) și DAPI (albastru) cu ajutorul software-lui CellSense Dimensions 1.5 software© Olympus Corporation.

VIC-urile încapsulate în gel GP-1 au fenotip alungit, specific și formează o rețea interconectată, evidențiată de filamentele de actină (colorația roșie) care delimitează forma celulelor (Figura 9 -





E), ceea ce sugerează că VIC-urile sunt compatibile cu hidrogelul GP-1 folosit. VEC însămânțate pe construct proliferază și formează un monostrat pe hidrogel (Figura 9 - D)

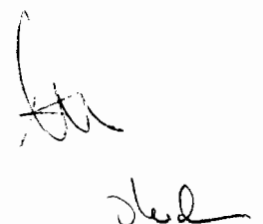
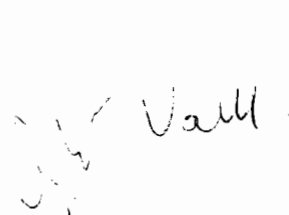
**b. *Expresia markerilor specifici VIC/VEC în modelul 3D***

Pentru analiza imunohistochimică a modelului 3D de valvă bioprintabilă, construcții au fost incluși în mediu OCT (optimal cutting temperature medium) și secționati la criotomul Leica CM1850.

După ce au fost menținuți în cultură pentru 14 zile, construcții au fost incubate în soluție 4% PFA (paraformaldehidă) preparată în tampon fosfat 0.1 M, pH 7.4 timp de 24h la 4°C, apoi spălați în tampon fosfat 0.1N. A urmat crioprotecția în soluții succesive de glicerol: 5% (15 minute, temperatura camerei), 10% (1h, 4°C), 20% (peste noapte, 4°C), 50% (1h, 4°C) și stocarea în glicerol 50% la -20°C până la includerea în OCT și secționarea la criotom. În vederea secționării, au fost parcurse următoarele etape: aducerea la 4°C a constructului, 6 spălări a câte 15 minute în soluție 3% sucroză preparată în tampon fosfat 0.1M, includerea în OCT timp de 30 minute, la temperatura camerei și înghețarea rapidă în azot lichid. Pentru obținerea secțiunilor de construct pe lame, blocurile înghețate au fost montate pe holder cu soluție OCT. Din fiecare probă s-a reușit colectarea mai multor secțiuni pe lame SuperFrost, tratate cu poli-L-lizină, la o grosime de 5 -7μm. Lamele au fost incubate timp de 30 minute la o temperatură de 37°C și păstrate în cutii speciale la -20°C, până la analiza microscopică.

Pentru marcarea secțiunilor cu anticorp: lamele cu secțiuni au fost mai întâi aduse la temperatura camerei, timp de 5-10 minute. A urmat uscarea secțiunilor la 37°C timp de 1h și fixarea în acetonă rece (-20°C) timp de 5 minute. Secțiunile au fost spălate în PBS în atmosferă umedă (3 spălări/5 minute) și incubate în tampon de blocare timp de 30 minute. A urmat incubarea în anticorpul primar peste noapte la 4°C în atmosferă umedă, spălarea cu PBS, incubarea în anticorpul secundar cuplat cu florocrom, spălarea secțiunilor de țesut cu PBS și cu apă distilată și includerea în soluție de montare care conține DAPI (pentru marcarea nucleilor celulari). Secțiunile obținute din construcții au fost vizualizate la microscopul inversat de fluorescență Olympus.

Secțiunile obținute au fost examinate pentru a evidenția expresia markerilor specifici pentru celule endoteliale CD31 și vWF, care sunt asociate cu monostratul exterior de VEC de pe constructul 3D (Figura 10 A). Pentru a evidenția celulele valvulare interstițiale din modelul 3D au fost utilizați anticorpi specifici pentru vimentină - marker pentru celulele interstițiale ne-activate și FSP-1 marker pentru celule de tip fibroblast. FSP-1 a fost localizat în principal în interiorul constructului,



zonă populată de VIC iar vimentina a fost localizată atât în interior cât și pe marginea constructului tridimensional la 14 zile, după cum se poate observa în Figura 10 B.

**c. Viabilitatea celulară în modelul de foiță valvulară bioprintată**

Viabilitatea celulelor după procesul de încapsulare și însămânțare în prezentul model a fost investigată la 7, 14 și 21 de zile utilizând kitul de viabilitate Live/Dead kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) urmând instrucțiunile producătorului.

După cum se poate observa în Figura 11, aproximativ 98% din celule au fost viabile după 7 zile. La 14 și 21 de zile numărul de celule viabile din modelul 3D depășește numărul de celule încapsulate în construct la ziua 0. Aceste rezultate ne arată că celulele sunt viabile și proliferază în modelul de valvă bioprintabilă.

**7) Evaluarea capacității modelului 3D de foiță valvulară de a forma centrul de calcificare – posibilitatea utilizării pentru studiul in vitro al calcificării valvei aortice**

Pentru a testa funcționalitatea constructului 3D obținut în prezenta invenție, ca model de studiu pentru calcificarea valvei aortice, acesta a fost expus la stimuli osteogenici – mediu control suplimentat cu 10mM  $\beta$ -glicerolfosfat, 10 ng/mL acid ascorbic, and  $10^{-8}$ M dexametazonă, timp de 14 zile (14-21 zile). Pentru a identifica depozitele de calciu de la nivelul modelului tridimensional de foiță valvulară, s-a realizat colorarea cu Alizarin Red. În acest scop, construcții au fost fixați cu paraformaldehidă (PFA) 4% la 37 °C, timp de 2 ore (1-3 ore). S-au realizat apoi 3 spălări cu PBS, urmate de incubarea construcțiilor cu o soluție de Alizarin Red de concentrație 2% timp de 10 minute.

Pentru îndepărtarea excesului de colorant, construcții au fost spălați cu PBS de trei ori. În scopul cuantificării gradului de calcifiere, s-a realizat eliberarea colorantului în mediu prin incubarea construcțiilor timp de 1 oră în acid acetic 10%. Neutralizarea acidului acetic s-a făcut cu o soluție de 10% hidroxid de amoniu (raport 1:1), iar mediul rezultat a fost cuantificat spectrofotometric prin citirea absorbției la 405 nm, valorile acesteia fiind direct proporționale cu nivelul depozitelor de calciu din construcții (Figura 12).

Expunerea la mediu osteogenic a construcțiilor 3D a stimulat producerea de centrul de calcificare, observată printr-o creștere semnificativă a absorbției, în urma colorației cu Alizarin Red, la nivelul construcțiilor menținuți în mediu osteogenic comparativ cu cei menținuți în mediu normal. Acest rezultat demonstrează capacitatea celulelor interstițiale din interiorul modelului 3D de a se



diferența în celule asemănătoare osteoblastelor, celule responsabile pentru formarea depozitelor de calciu.

Totodată se observă o calcificare de aproximativ două ori mai crescută în cazul construcțiilor care au avut numai VIC la interior comparativ cu cei care au fost însămânțați și cu VEC la exterior. Aceste date demonstrează capacitatea modelului de a răspunde la stimuli externi, posibilitatea de a forma centrul de calcificare – aspect deosebit de important pentru studiul *in vitro* al calcificării valvei aortice, dar și existența unei comunicări inter-celulare între VIC și VEC, ceea ce determină un răspuns celular foarte apropiat de cel fiziologic.

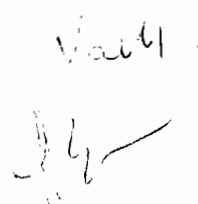


Valu



## REVENDICĂRI:

1. **Procedeu de obținere a unui model 3D de foiță valvulară bioprintabilă**, caracterizat prin aceea că pe suprafața a unui model 3D sunt poziționate în monostrat celule VEC și în tot volumul sunt distribuite sub forma de rețea celule VIC printr-o succesiune de etape, care încep cu selectarea materialelor, urmează o serie de etape pentru obținerea și caracterizarea celulelor valvulare umane utilizate, care încep cu izolarea celulelor VEC și VIC din valve umane, în final VIC-urile izolate din valve umane prezintă markerii de celule mezenchimale vimentină și  $\alpha$ -SMA iar VEC-urile prezintă markerul endotelial von Willebrand factor (vWF), urmează etape pentru obținerea hidrogelului GP-1 necesar realizării unui model bioprintabil, model care se conturează inițial prin realizarea unui desen tri-dimensional cu ajutorul unui program software și care va transmite la finalizarea lui informația la o bioimprimantă, prevăzută cu 4 capete de printare diferite, în final modelul bioprintabil are o formă de disc cu diametrul de 14mm și o înălțime de aproximativ 1 mm, realizat din 3-4 straturi de hidrogel, fiecare strat fiind proiectat ca o serie de rânduri orizontale sau verticale, constructul formând un grilaj cu ochiuri pentru o mai bună infiltrare a mediului de cultură, dimensiunea modelului a fost limitată de utilizarea unor plăci de cultură standard, de 24 de godeuri, în etapele de realizare a modelului 3D de foiță valvulară un amestec de suspensie celulară de VIC la o densitate de  $1 - 10 \cdot 10^6$  celule/ml se amestecă cu GP-1, care se încarcă în seringă bioimprimantei, urmează printarea și o etapa de fotopolimerizare a hidrogelului, după reticulare construcții 3D sunt transferați în mediu de cultură DMEM 1 – 4.5 % glucoză + 1-20% ser fetal bovin + antibiotice și incubăți timp de 24h la 37°C, mediul de cultură este reînnoit după 24 de ore pentru a înlătura resturile celulare și alginatul de sodiu, peste constructul 3D cu celule VIC încapsulate în interior sunt însămânțate celule VEC la exterior, la o densitate  $5-10 \cdot 10^4$  celule/cm<sup>2</sup> și modelul 3D este menținut în incubatorul de culturi celulare la 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, după 48 de ore de la însămânțarea celulelor endoteliale se observă un strat confluent de celule VEC la suprafața modelului 3D și formarea unei rețele celulare interne de celule VIC la interior; urmează o serie de etape de caracterizare și analiza celulelor în modelul 3D de foiță valvulară bioprintabilă; ultimele etape fiind de evaluare a capacității modelului 3D de foiță valvulară de a forma centrul de calcificare și posibilitatea utilizării pentru studiul *in vitro* al calcificării valvei aortice


2. **Procedeu de obținere a unui model 3D de foiță valvulară bioprintabilă**, conform cu revendicarea 1, caracterizat prin aceea ca materialele selectate necesare sunt din categoria: alginat de sodiu din alge brune cu vâscozitate medie 15-25cps, 2% (25 C); gelatină porcină de tip A - derivată după hidroliza acidă a pielii de porc, având vâscozitatea de aproximativ 300, conform test Bloom, masă moleculară de aprox. 75.000-100.000Da; amestec de colagenaze izoformele I și II din *Clostridium histolyticum* și de Dispaza - proteaza neutră obținută din *Bacillus polymyxa* – Liberase; soluție tampon fosfat de sodiu salin 1x (PBS: 137mM clorură de sodiu, 2.7mM clorură de potasiu, 10mM fosfat disodic, 1.8mM fosfat de potasiu monobazic, pH 7.2 - 7.4 la temp. 25°C; anhidridă metacrilică 94-98%; antibiotic: penicilină, streptomycină și amfotericină B; soluție de 100x - 10.000U/ml penicilină și 10mg/ml streptomycină, amfotericină B 25μg/ml; sac pentru dializă din celuloză cu pori de 10.000-14.000kDa; fotoinițiator Irgacure2959 - 2-Hidroxi-4'-(2-hidroxi-etoxi)-2-metilpropiofenonă ; liberaza; mediu de cultură DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium 1 mg/ml glucoză, suplimentat cu SFV- ser fetal bovin 1-20%; consumabile sterile pentru culturi celulare.

3. **Procedeu de obținere a unui model 3D de foiță valvulară bioprintabilă**, conform cu revendicările 1 și 2, caracterizat prin aceea că pentru întreținerea culturilor celulare și a constructului bioprintat se utilizează un incubator cu umidificare și o concentrație a CO<sub>2</sub> de 5% și o hotă de flux laminar pentru lucru în condiții aseptice iar pentru pregătirea hidrogelului se utilizează o plită termostatăă cu agitare magnetică.

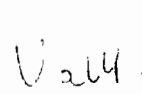
4. **Procedeu de obținere a unui model 3D de foiță valvulară bioprintabilă**, conform cu revendicările 1, 2 și 3, caracterizat prin aceea că pentru izolarea VEC, foițele de valvă aortică sunt spălate cu PBS steril, rece apoi supuse reacției de digestie enzimatică în colagenază 400-800U/ml pentru 5' în incubator, la 37°C, suspensia celulară rezultată este centrifugată pentru 7', 1050 rpm, 24°C, sedimentul rezultat este cultivat pe plăci de cultură tip Petri acoperite cu gelatină porcină 1% în mediu EGM-2, mediu special pentru cultivarea celulelor endoteliale, care conține heparină și factori de creștere, de tip FGF, VEGF, IGF, EGF, cu 20% (10-20%), ser fetal bovin și antibiotice penicilină 100U/ml și streptomycină 100μg/ml, operațiunea se repetă de 2 ori pentru extragerea a cât mai multe VEC, celulele sunt monitorizate și mediul este schimbat o dată la două zile.

5. **Procedeu de obținere a unui model 3D de foiță valvulară bioprintabilă**, conform cu revendicările 1-4, caracterizat prin aceea ca pentru izolarea VIC, foița valvulară este în

continuare supusă digestiei enzimatice cu 400-800U/ml de Liberaza, pentru un timp mai îndelungat, suspensia rezultată după 4-5 ore de digestie, este centrifugată pentru 7', 300g, 24°C; iar sedimentul celular obținut este cultivat în plăci Petri în DMEM cu 10-20% ser fetal bovin și antibiotice penicilină 100U/ml și streptomycină 100μg/ml, digestia enzimatică a țesutului rămas este continuată peste noapte în Liberaza, urmând însămânțarea celulelor obținute în DMEM 1 – 4.5 %o glucoză + 1-20% ser fetal bovin; schimbarea de mediu pentru VIC izolate are loc o data la 2 zile.

6. **Procedeu de obținere a unui model 3D de foiță valvulară bioprintabilă**, conform cu revendicările 1-5, caracterizat prin aceea că pentru a obține hidrogelul GP-1 este folosit un protocol adaptat, astfel, gelatina porcine GP este dizolvată în tampon fosfat pH 9-9.2 la 40°C la o concentrație finală de (4-20%), peste soluția obținută este adăugată anhidridă metacrilică de 94% în raport 0.04ml:1g gelatină, adăugarea se face lent cu picătura și agitare magnetică continuă, reacția de substituere se realizează timp de 1 oră la temperatura de 45°C pe agitator, inactivarea reacției se face prin scăderea pH-ului până la pH4.5 adăugând 3ml de HCl 1M la 50ml de soluție amestec, după inactivarea soluției de gelatină metacrilată este adăugat antibiotic la o concentrație finală de 500U/ml penicilină, 500μg/ml streptomycină, 12.5μg/ml amfotericină B, amestecul este incubat timp de 30min la 37°C și soluția obținută este transferată în saci de dializă sterili, gelatina este dializată timp de 7 zile la 37°C în apă, protejată de lumină și cu schimbarea apei de cel puțin 3 ori pe zi, după dializă, gelatina este filtrată steril și păstrată la -80°C până la liofilizare, care se realizează timp de 48 ore la presiunea de 0.040 mbar și temperatura de -40°C, gelatina liofilizată este dizolvată în PBS 1x, pH 7.4 la o concentrație de 10% m/v și este adăugată soluția de Alginat de sodiu la o concentrație finală de 1% omogenizarea se realizează timp de 1h pe plită magnetică termostată la 37°C, fotoinițiatorul Irgacure 2959, preparat proaspăt înainte de folosire, este dizolvat în alcool etilic absolut cu concentrația finală de 10%, și este folosit în raport de 0.1%:1g gelatină metacrilată, amestecarea se realizează timp de 30 de minute cu agitarea continuă până la omogenizarea completă a acestuia.

7. **Procedeu de obținere a unui model 3D de foiță valvulară bioprintabilă**, conform cu revendicările 1-6, caracterizat prin aceea că hidrogelul GP-1 este amestecat cu o suspensie celulară de VIC la o densitate de  $1 - 10 \cdot 10^6$  celule/ml, pentru a nu interfera cu fotopolimerizarea, este folosit mediu fara fenol red, amestecul de VIC și GP1 este încărcat în seringă bioimprimantei, după realizarea modelului tridimensional prin extruderea pneumatică sau



depunerea în picătură, urmează etapa de fotopolimerizare a hidrogelului, care este realizată cu ajutorul lămpii UV LED încorporate în bioimprimanta, hidrogelul a fost expus timp de 60 secunde la o radiație UV cu lungimea de unda de 365nm și o putere de 280-300mWatt/cm<sup>2</sup>, fotoinițiatorul Irgacure este stimulat de radiația UV și inițiază reacția de înrețelare a gelatinei cu formarea de grupări metacrilolil, după reticulare construcții 3D sunt transferați în mediu de cultură DMEM 1 – 4.5 % glucoză + 1-20% ser fetal bovin + antibiotice și incubați timp de 24h la 37°C, timp în care alginatul de sodiu este eliberat în mediu conferind gelului o structură poroasă, propice dezvoltării celulare. Mediul de cultură a fost reînnoit după 24 de ore pentru a înlătura resturile celulare și alginatul de sodiu.

8. **Procedeu de obținere a unui model 3D de foiță valvulară bioprintabilă**, conform cu revendicările 1-7, caracterizat prin aceea că în etapele de caracterizare a celulelor în modelul 3D de foiță valvulară bioprintabilă se constată faptul că la 7 zile de la însămânțarea VEC se observă un strat confluent de celule endoteliale valvulare la suprafața modelului 3D și formarea unei rețele celulare interne de celule VIC la interior, pentru vizualizarea filamentelor de actină, și astfel a populării cu celule dar și a morfologiei celulelor în modelul 3D de foiță valvulară se realizează fixarea și colorarea construcțiilor cu faloidină-rodamină, pentru asta construcții 3D sunt fixați în PFA 2-8% pentru 4h la 4°C și permeabilizați cu Triton X-100 0.05 -3% timp de 5'-20', după această etapă urmează o incubare cu faloidină-rodamină la o concentrație de 120 ng/ml în PBS pentru 20- 60 minute la temperatură camerei, apoi 3 spălări cu PBS pentru îndepărtarea faloidinei-TRITC nelegată, urmează colorarea nucleilor celulelor cu DAPI, 3x spălări cu PBS și vizualizarea la microscopul de fluorescență, sunt achiziționate imagini de contrast de fază și fluorescență, VIC-urile încapsulate în gel GP-1 au fenotip alungit, specific și formează o rețea interconectată, evidențiată de filamentele de actină colorația roșie, care delimitează forma celulelor, ceea ce sugerează că VIC-urile sunt compatibile cu hidrogelul GP-1 folosit. VEC însămânțate pe construct proliferază și formează un monostrat pe hidrogel.


9. **Procedeu de obținere a unui model 3D de foiță valvulară bioprintabilă**, conform cu revendicările 1-8, caracterizat prin aceea că pentru analiza imunohistochimică a modelului 3D de valvă bioprintabilă, construcții sunt incluși în mediu OCT - optimal cutting temperature medium și secționați. După ce sunt menținuți în cultură pentru 14 zile, construcții sunt incubați în soluție 2-8% PFA -paraformaldehidă preparată în tampon fosfat 0.1 M, pH 7.4 timp de 24h la 4°C, apoi spălați în tampon fosfat 0.1N, urmează crioprotecția în soluții succesive de glicerol:

5%, 15 minute, temperatura camerei, 10% (1h, 4°C), 20%, peste noapte, 4°C, 50% (1h, 4°C) și stocarea în glicerol 50% la -20°C până la includerea în OCT și secționarea la criotom. În vederea secționării, sunt parcurse următoarele etape: aducerea la 4°C a constructului, 6 spălări a câte 15 minute în soluție 3% sucroză preparată în tampon fosfat 0.1M, includerea în OCT timp de 30 minute, la temperatura camerei și înghețarea rapidă în azot lichid, pentru obținerea secțiunilor de construct pe lame, blocurile înghețate se montează pe holder cu soluție OCT, din fiecare probă se colectează mai multe secțiuni pe lame SuperFrost, tratate cu poli-L-lizină, la o grosime de 5 - 7μm, lamele fiind incubate timp de 30 minute la o temperatură de 37°C și păstrate în cutii speciale la -20°C, până la analiza microscopică, pentru marcarea secțiunilor cu anticorp: lamele cu secțiuni au fost mai întâi aduse la temperatura camerei, timp de 5-10 minute, urmează uscarea secțiunilor la 37°C timp de 1h și fixarea în acetonă rece (-20°C) timp de 5 minute, secțiunile sunt spălate în PBS în atmosferă umedă (3 spălări/5 minute) și incubate în tampon de blocare timp de 30 minute, urmează incubarea în anticorpul primar peste noapte la 4°C în atmosferă umedă, spălarea cu PBS, incubarea în anticorpul secundar cuplat cu florocrom, spălarea secțiunilor de țesut cu PBS și cu apă distilată și includerea în soluție de montare care conține DAPI, pentru marcarea nucleilor, secțiunile obținute din construcții sunt vizualizate la microscop inversat de fluorescență, secțiunile obținute sunt examinate pentru a evidenția expresia markerilor specifici pentru celule endoteliale CD31 și vWF, care sunt asociate cu monostratul exterior de VEC de pe constructul 3D, pentru a evidenția celulele valvulare interstițiale din modelul 3D au fost utilizați anticorpi specifici pentru vimentină - marker pentru celulele interstițiale ne-activate și FSP-1, marker pentru celule de tip fibroblast. FSP-1 este localizat în principal în interiorul constructului, zonă populată de VIC iar vimentina este localizată atât în interior cât și pe marginea constructului tridimensional la 14 zile.

10. **Procedeu de obținere a unui model 3D de foiță valvulară bioprintabilă**, conform cu revendicarile 1-9, caracterizat prin aceea ca pentru a testa funcționalitatea constructului 3D obținut pentru calcificarea valvei aortice, acesta este expus la stimuli osteogenici – mediu control suplimentat cu 10 mM β-glicerolfosfat, 10 ng/mL acid ascorbic, and 10<sup>-8</sup>M dexametazonă, timp de 14-21 zile, pentru a identifica depozitele de calciu de la nivelul modelului tridimensional de foiță valvulară, s-a realizat colorarea cu Alizarin Red, în acest scop, construcții au fost fixați cu paraformaldehidă (PFA) 4% la 37 °C, timp de 1-3 ore, s-au realizat apoi 3 spălări cu PBS, urmate de incubarea construcțiilor cu o soluție de Alizarin Red de concentrație 2% timp de 10



minute, pentru îndepărtarea excesului de colorant, construcții au fost spălați cu PBS de trei ori, în scopul cuantificării gradului de calcifiere, s-a realizat eliberarea colorantului în mediu prin incubarea construcțiilor timp de 1 oră în acid acetic 10%; neutralizarea acidului acetic s-a făcut cu o soluție de 10% hidroxid de amoniu (raport 1:1), iar mediul rezultat a fost cuantificat spectrofotometric prin citirea absorbției la 405 nm, valorile acestea fiind direct proporționale cu nivelul depozitelor de calciu din construcții.



Vall.

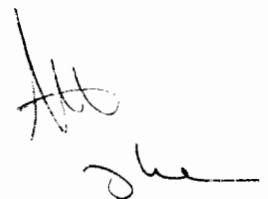


Fig. 1

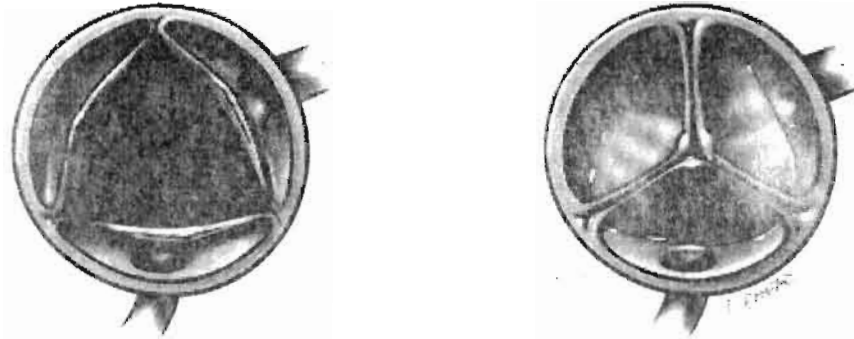
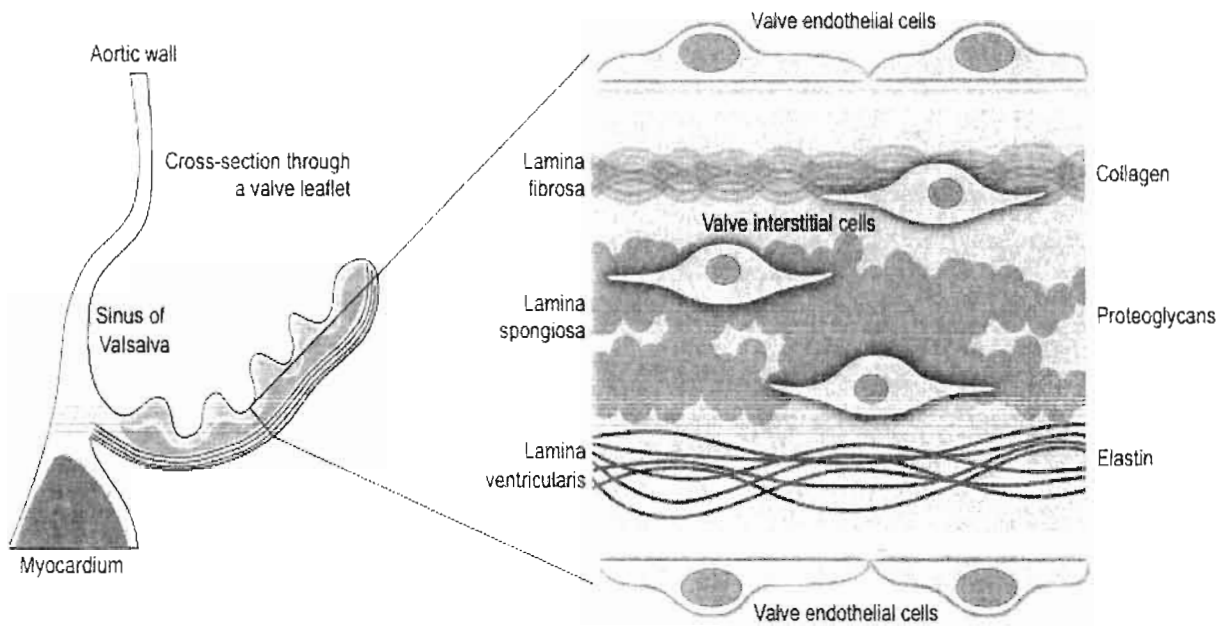


Fig. 2



*coll*

*elk*

*Valv.*

*1/5-*

*the du*

Fig. 3

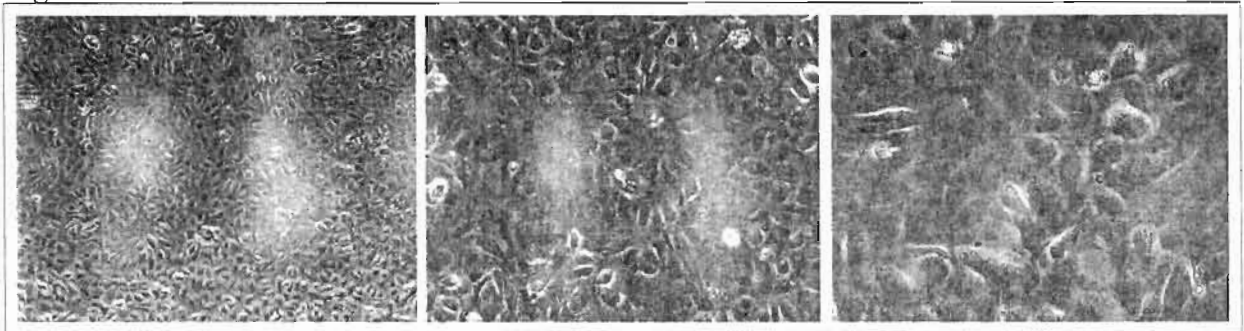


Fig. 4.

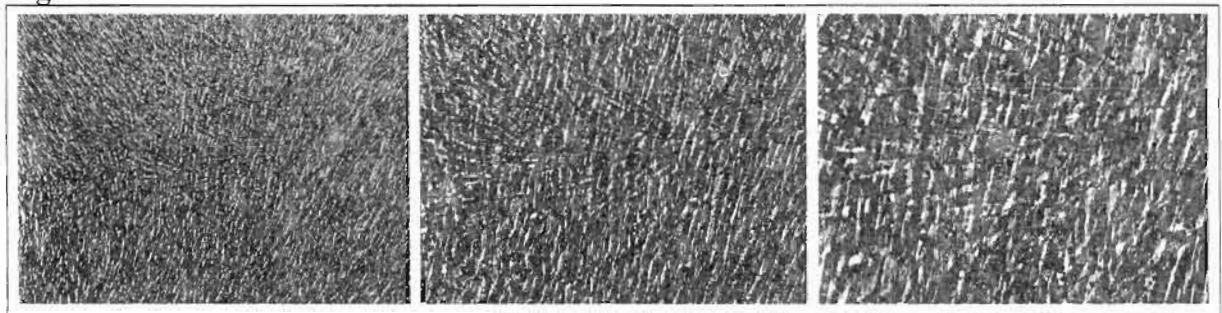
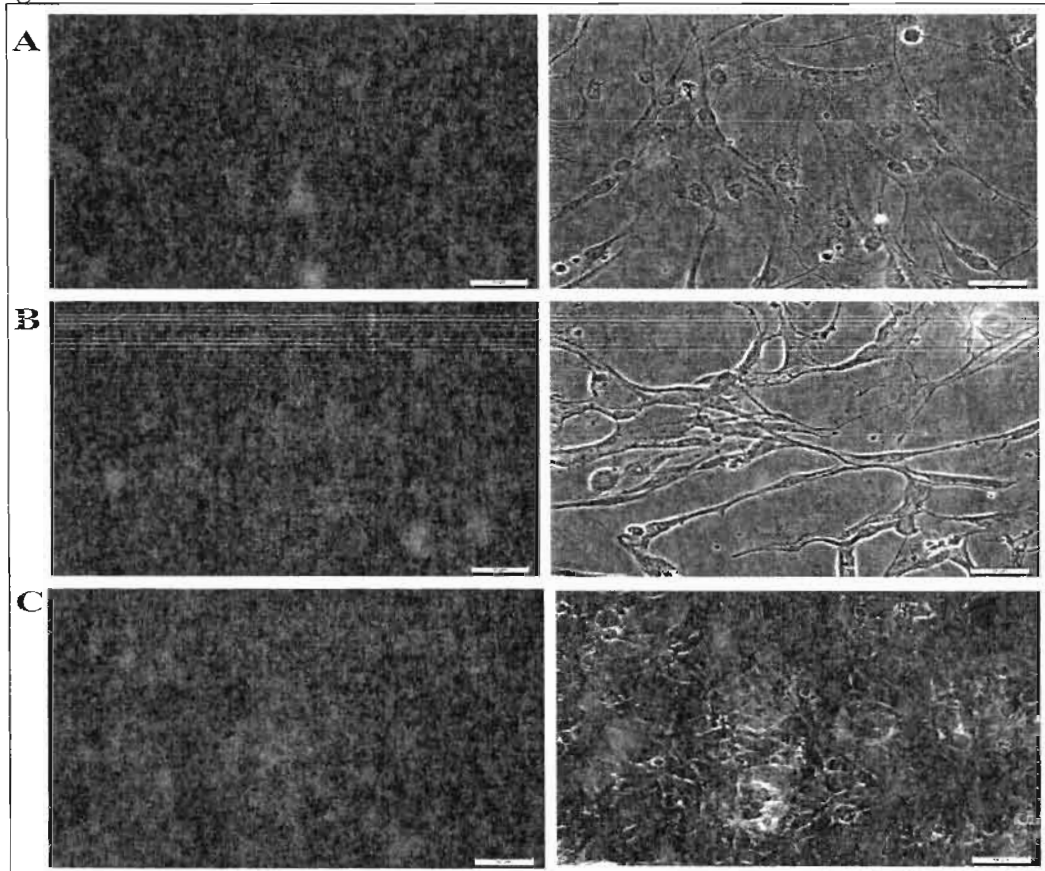


Fig. 5



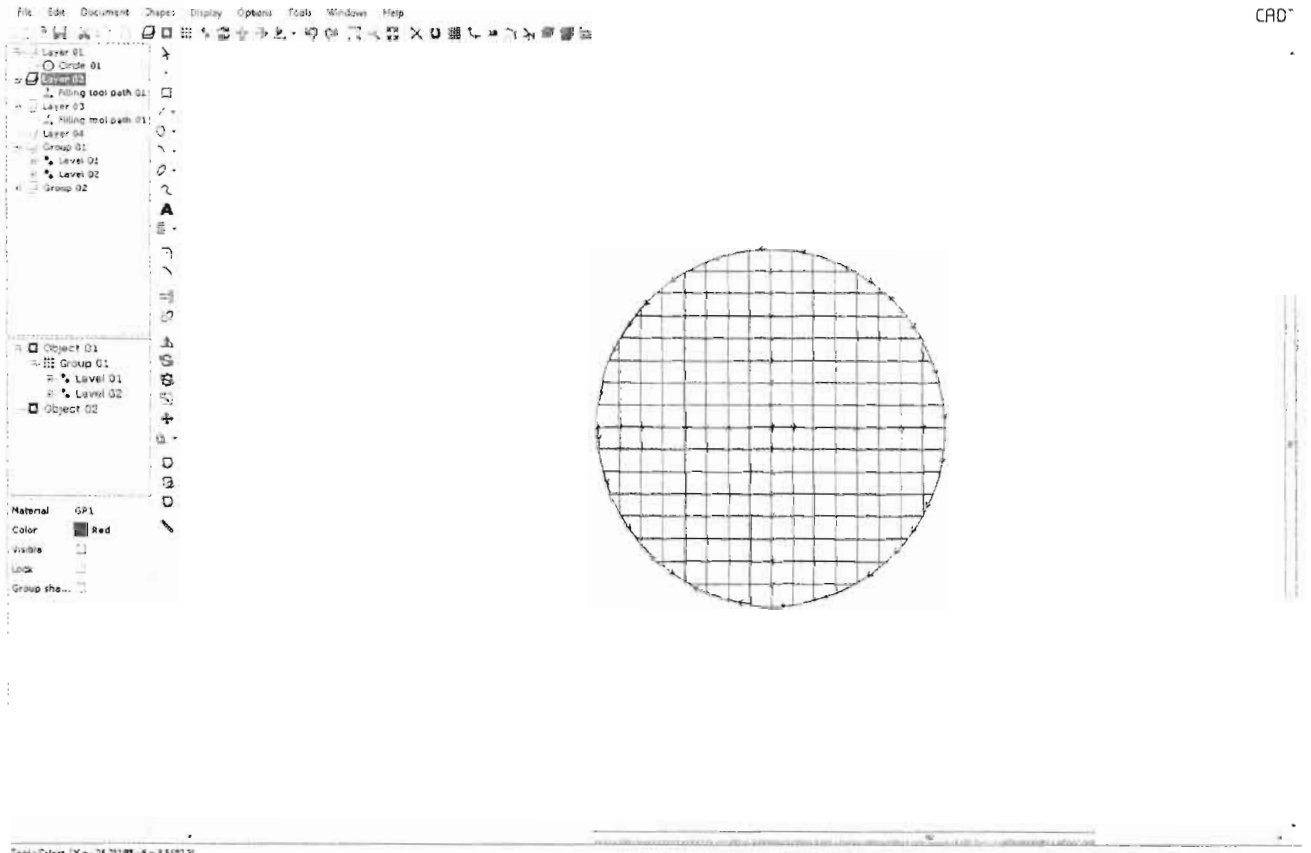
*Carl*

*Atop*

*Wall*

*Mc  
She*

Fig. 6



*Coalt*

*Other*

*Vall.*

*Fig 6*

*All*

*Ind*

45

Fig. 7

regenHU 3D Discovery (8.23.3.20)

File Parameter Help

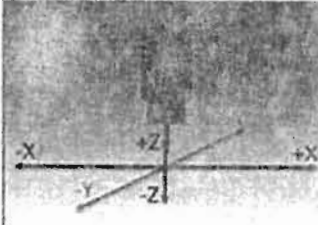
Process Protocol (G-Code)

STRAT 1-12G.iso

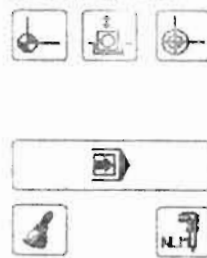
```

[Beginning [Group 01_Level 01_Layer 02]]
G0 Z30
M99
M90 P1 01
M95 P1
G0 X:3.317 Y5
G0 Z0 3
M97
F5 G1 X3.317 Y5
G2 X4.472 Y4 I:0.001 J:0.001
G1 X:4.472 Y4
G3 X:5.196 Y3 I0 J0
G1 X5.196 Y3
G2 X5.657 Y2 I0.001 J:0.001
G1 X:5.657 Y2
G3 X:5.916 Y1 I0 J0.001
G1 X5.916 Y1
G2 X6 Y0 I0 J0
G1 X:6 Y0
G3 X:5.916 Y:1 I0 J0
G1 X5.916 Y:1
G2 X5.657 Y:2 I0 J:0.001
G1 X:5.657 Y:2
G3 X:5.196 Y:3 I0 J0.001
G1 X5.196 Y:3
G2 X4.472 Y:4 I0 J0
G1 X:4.472 Y:4
G3 X:3.317 Y:5 I0.001 J:0.001
G1 X3.317 Y:5
M96
G0 Z1 3
M98
[Ending [Group 01_Level 01_Layer 02]]
                
```

Manual Operation



Automatic Operation



STOP

0.01 0.10 1.00 10.0

Actual Position, [mm] absolute

**X** -218.081 **Y** -169.024 **Z** 67.876

Actual Settings

Feed	Feed	Op.Time:	Op.Time:
20.00 mm/s	0.00 mm/s	00:00:00	h:m:s
1.20 mm/min	0.00 mm/min	Pulse-Break:	Break individual

Printhead Changer

PH1  PH2  PH3  PH4 UV-LED

Cartridge Pressure

Permanent dispense

*Carl*

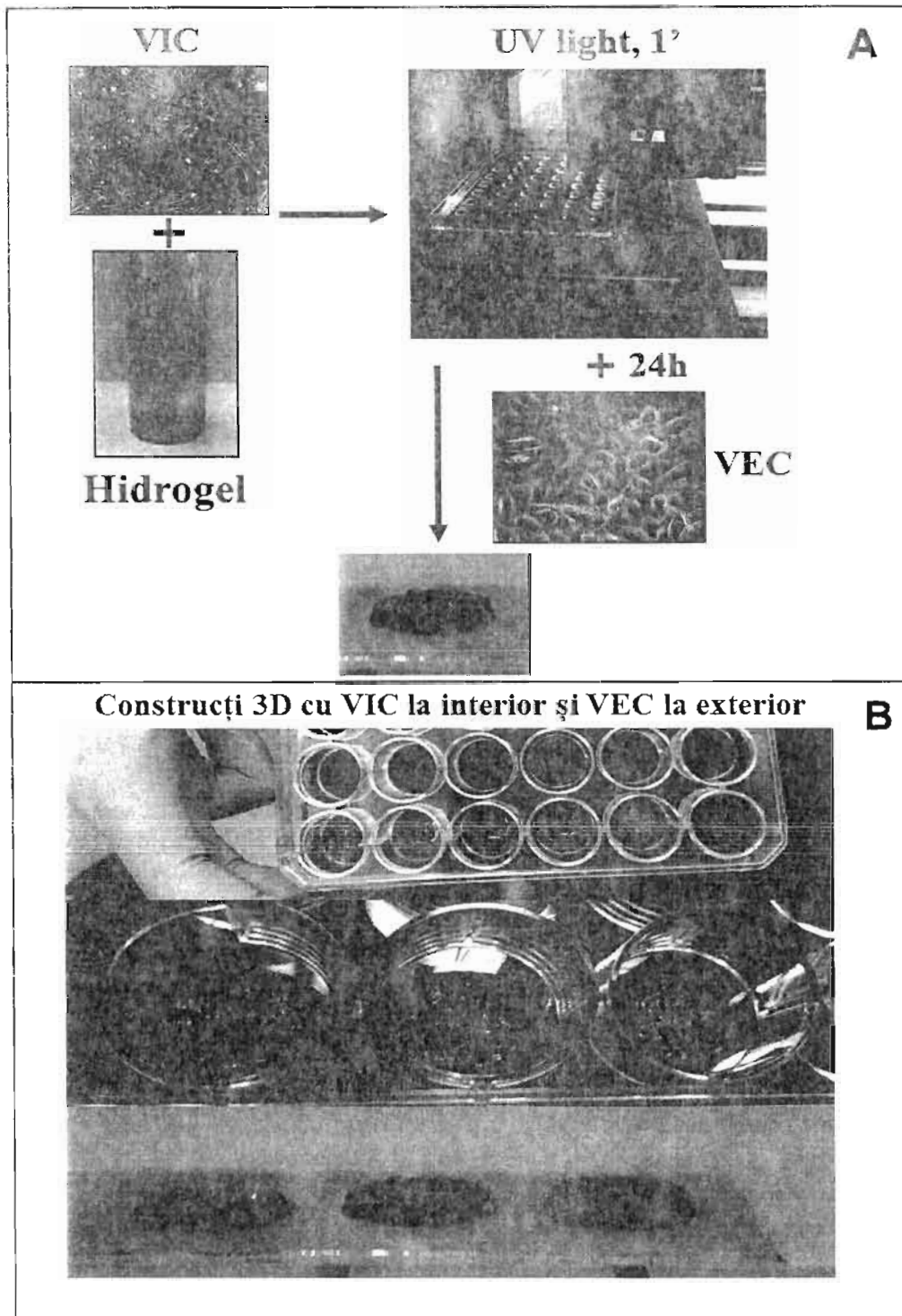
*Ray*

*Jan*

*Alte*

*YB*  
*X*

Fig. 8



*Costa*

*Ata*

Vall

*Ata*

Fig. 9

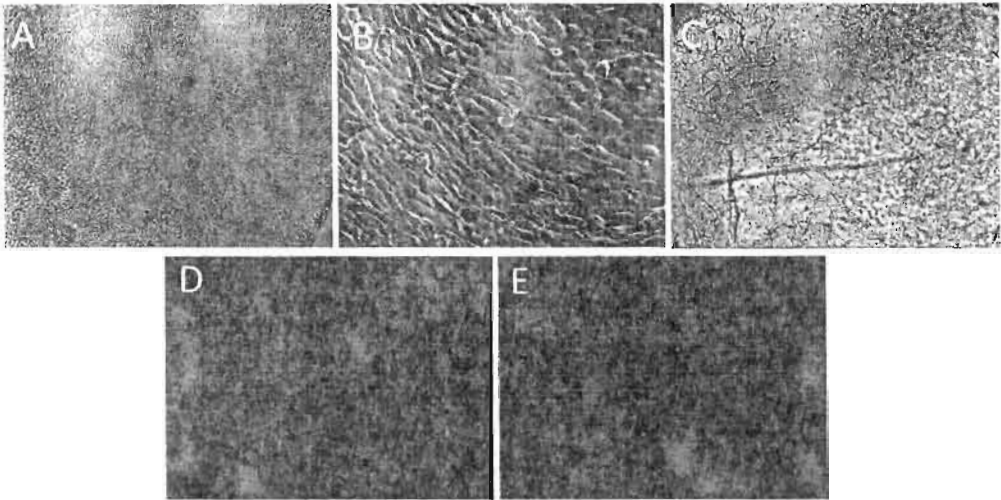
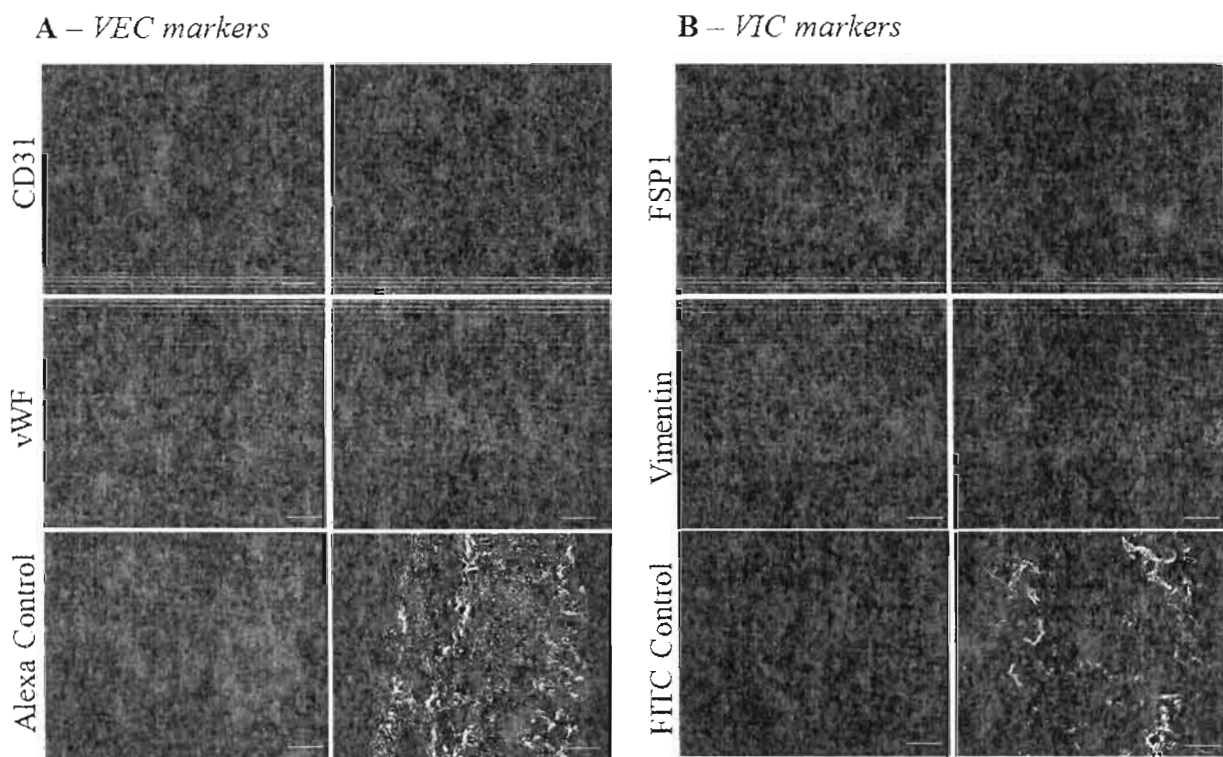


Fig. 10



*Luca*

*Chen*

*Vall*  
*Sty*  
*sh*

Fig. 11

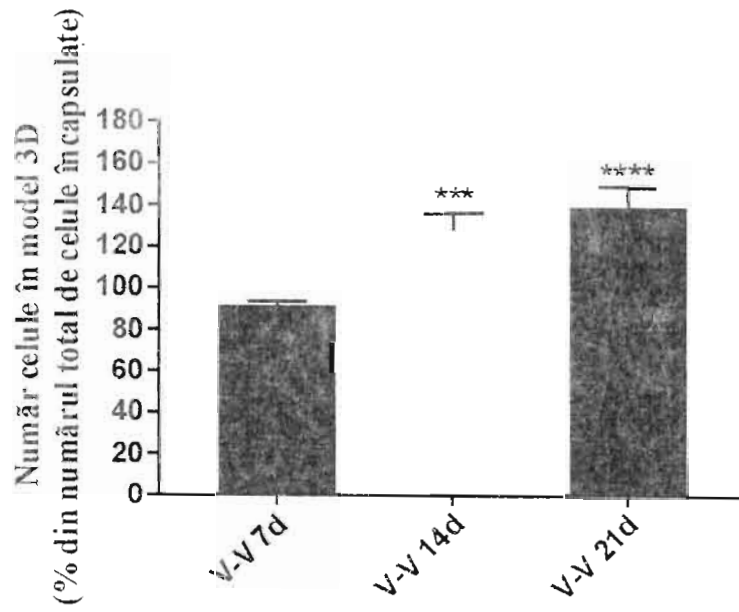
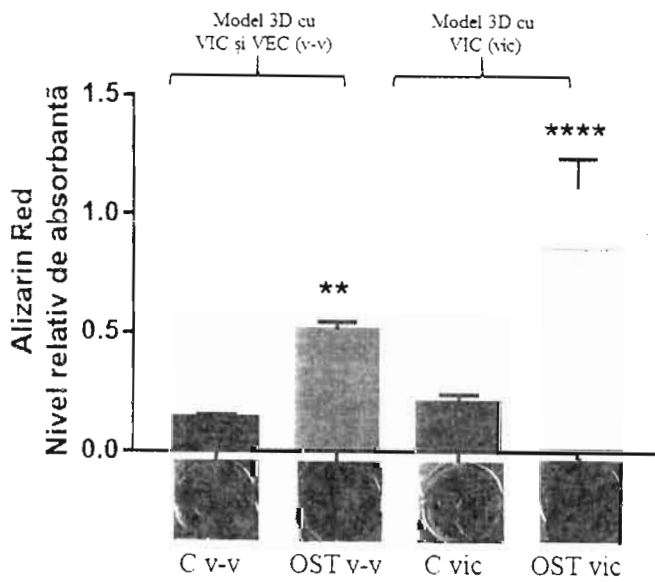


Fig. 12



*[Handwritten signature]*

*Vall*

*[Handwritten signature]*

*[Handwritten signature]*

*[Handwritten signature]*