

**Academia
Oamenilor de Știință
din România**



**Academy
of Romanian
Scientists**

Adă: Str. Ilfov nr. 3 sector 5, 050045, București, ROMANIA. Cod Fiscal: 5091859
Tel. 00-4021/314.74.91; Fax. 00-4021/314.75.39, Web-site: www.aosr.ro, E-mail: aosromania@yahoo.com

Domeniul: Științe ale informației

Platformă skin on chip pentru testarea *in vitro* a nanoparticulelor

Raport 4

Perioada: 01.07.2025 – 30.11.2025

Membri echipă proiect

Dr. Ing. Daniel Măriuța

Dr. Biochim. Mina Ghiță Răileanu

Dr. Biochim. Bianca-Maria Tihăuan

dermice, este considerată standardul actual datorită capacității acestora de a reproduce fenotipul *ex vivo* și de a permite realizarea unor modele fiziologice relevante [5], [6].

Modelele actuale de piele *in vitro* variază de la epidermă umană reconstruită (RHE), utilizată pe scară largă ca metodă standardizată pentru testarea iritației cutanate, până la modele complexe de tip *full-thickness*, care includ atât compartimentul epidermic, cât și cel dermic. Evoluțiile recente au permis integrarea unor componente suplimentare, precum melanocite, celule endoteliale, celule imune de tip Langerhans, adipocite sau celule neuronale, în scopul unei mimări cât mai fidele a micro-mediului cutanat. Din rapoartele anterioare s-a reliefat totodată faptul că, în ciuda progreselor notabile, proiectarea acestor modele rămâne limitată de capacitatea redusă de proliferare a celulelor primare, de variabilitatea inter-donator, de dificultățile tehnice de co-cultură și de constrângerile etice și de reglementare asociate [2].

Un progres esențial în dezvoltarea platformelor SoC a fost introducerea microfluidicii, care permite separarea compartimentelor apicale și bazale și recrearea condițiilor dinamice de perfuzie, similare celor existente *in vivo*. Din rapoartele anterioare evidențiem că utilizarea membranelor semipermeabile și a suporturilor permeabile este o metodă consacrată pentru realizarea barierelor biologice în sistemele *organ-on-a-chip*, fiind aplicată cu succes în modele pulmonare, intestinale, hepatice și cutanate. Cu toate acestea, realizarea unui model de piele de grosime completă implică provocări tehnologice suplimentare, precum polimerizarea controlată a matricei dermice, însămânțarea uniformă a celulelor, menținerea viabilității tisulare pe termen lung și accesul ulterior la țesut pentru analize structurale și funcționale [7].

Alternativele tehnologice recente includ utilizarea interfețelor gel-lichid, a ghidajelor de fază și a structurilor microfabricate pentru susținerea țesuturilor, precum și bioimprimarea tridimensională a tuburilor integrate în matricea extracelulară. Aceste abordări au demonstrat un potențial remarcabil în modelarea unor arhitecturi tisulare complexe, însă sunt încă limitate de costuri ridicate, necesitatea unui personal înalt specializat și probleme de reproductibilitate și standardizare [8]. Din rapoartele anterioare a fost subliniat faptul că, deși platformele comerciale existente oferă rezultate reproductibile pentru anumite aplicații, acestea nu pot reflecta pe deplin diversitatea genetică și fiziologică a pielii umane, în special în cazul modelelor pigmentate sau de grosime completă.

Un avantaj major al platformelor SoC îl reprezintă posibilitatea realizării studiilor toxicocinetice (TK) și toxicodinamice (TD) într-un cadru controlat, cu un consum foarte redus de

celule și reactivi, comparativ cu modelele convenționale. Integrarea microsenzorilor permite monitorizarea în timp real a parametrilor fiziologici esențiali, precum rezistența electrică transepitelială (TEER), permeabilitatea, stresul mecanic și răspunsurile celulare la stimuli chimici sau fizici. Totodată, platformele SoC permit studiul unor procese complexe precum absorbția, iritația, coroziunea, hidratarea, genotoxicitatea și transferul transdermic al substanțelor active. Cu toate acestea, reproducerea fidelă a matricei extracelulare, contractilitatea colagenului în prezența fibroblastelor și menținerea stabilității structurale a țesuturilor rămân provocări tehnice majore.

În contextul nevoii tot mai accentuate de metode alternative la testarea ce utilizează modele animale, care să respecte principiile etice și să ofere rezultate predictive superioare, proiectul de față vizează dezvoltarea unei platforme avansate de tip *Skin-on-Chip* pentru testarea *in vitro* a nanoparticulelor destinate administrării transdermice. Din rapoartele anterioare a fost stabilit cadrul conceptual și tehnologic al proiectului, precum și direcțiile principale de dezvoltare. Obiectivul general al proiectului îl constituie elaborarea unui protocol complet pentru realizarea unei „pielii biomimetice” utilizabile în condiții statice, integrată cu un senzor TEER pentru monitorizarea în timp real a integrității barierei celulare.

Pentru atingerea acestui obiectiv, activitățile sunt structurate pe direcții clare ce prevăd o abordare integrată care permite corelarea proprietăților nanosistemelor cu răspunsul biologic al modelului cutanat și oferă o bază solidă pentru etapele ulterioare de testare funcțională și validare experimentală.

Prin urmare, raportul de față se încadrează într-o etapă de tranziție esențială de la fundamentarea teoretică și analiza stadiului actual al domeniului, realizate în rapoartele anterioare, către o etapă experimentală avansată, orientată pe dezvoltarea și validarea efectivă a componentelor platformei *Skin-on-Chip*. Rezultatele prezentate în acest raport contribuie la consolidarea infrastructurii tehnologice necesare pentru realizarea unui model biomimetic funcțional al pielii, cu aplicații directe în farmacologie, toxicologie și dermatologie.

Rezultate parțiale

În raportul anterior a fost prezentată fundamentarea științifică a dezvoltării unei platforme tip *Skin-on-Chip* pentru testarea *in vitro* a nanoparticulelor, precum și analiza stadiului actual al tehnologiilor utilizate în modele biomimetice de piele, inclusiv tipurile de surse celulare, arhitecturile 3D și avantajele microfluidicii în evaluarea transdermică a substanțelor active. De asemenea, au fost identificate principalele limitări ale modelelor existente și necesitatea dezvoltării unor sisteme reproductibile, standardizabile și etice pentru testarea preclinică.

În etapa precedentă, se prezintă progresele realizate în cadrul Obiectivului O1, care vizează elaborarea protocolului de obținere a unei „piele biomimetice” și dezvoltarea unor nanosisteme lipidice destinate livrării controlate a substanțelor active. În baza rezultatelor din fazele anterioare, a fost selectat un nanosistem de tip *transethozom* ca vehicul optim pentru transportul substanței active, datorită flexibilității crescute și capacității superioare de penetrare cutanată. Canabidiolul (CBD) a fost ales ca moleculă model pentru testarea transferului transdermic, având potențial antiinflamator, antimicrobian și regenerativ, dar prezentând limitări semnificative de solubilitate și biodisponibilitate.

Au fost elaborate și optimizate protocoalele de obținere a transethozomilor prin dispersie mecanică asistată și prin tehnica *hydrodynamic flow focusing*, utilizată ca metodă avansată pentru obținerea controlată și reproductibilă a nanosistemelor. Caracterizarea fizico-chimică realizată prin microscopie electronică de transmisie (TEM), difracție dinamică a luminii (DLS) și difracție de raze X (XRD) a confirmat formarea unor particule cu dimensiuni medii cuprinse între 150 și 220 nm, o distribuție dimensională adecvată, potențial Zeta negativ indicând stabilitate coloidală bună, precum și încorporarea eficientă a CBD într-o stare amorfă, favorabilă creșterii solubilității și biodisponibilității.

În raportul anterior a fost subliniată importanța validării biologice a nanosistemelor încă din fazele incipiente ale dezvoltării. În consecință, a fost realizată evaluarea biocompatibilității *in vitro* pe fibroblaste dermice umane și keratinocite epiteliale utilizând testele XTT, LDH și testul Live/Dead. Rezultatele obținute au demonstrat o viabilitate celulară de peste 90% și o citotoxicitate sub 15% pentru ambele tipuri celulare, confirmând siguranța biologică a transethozomilor încărcăți cu CBD și compatibilitatea acestora cu aplicațiile transdermice.

Tot în această fază a fost realizată proiectarea unei configurații microfluidice tridimensionale pentru obținerea rapidă și controlată a nano-lipozomilor încărcăți cu CBD, precum

și fundamentarea tehnologică pentru integrarea ulterioară a senzorului TEER destinat monitorizării în timp real a integrității barierei cutanate. Această etapă reprezintă o bază tehnologică esențială pentru etapele următoare de realizare efectivă a modelului *Skin-on-Chip*.

În concluzie, s-a pus în evidențiază trecerea de la etapa conceptuală și de analiză teoretică, prezentată în raportul anterior, la o etapă experimentală solid fundamentată, în care au fost validate atât din punct de vedere fizico-chimic, cât și biologic nanosistemele destinate integrării în platforma *Skin-on-Chip*. Rezultatele obținute confirmă fezabilitatea continuării proiectului în direcția realizării unui model biomimetic funcțional, cu aplicabilitate în testarea preclinică a livrării transdermice a substanțelor bioactive.

În cadrul etapei curente (01.07.2025 - 30.11.2025), obiectivul principal a fost *Proiectarea și fabricarea prototipului incubator-SoCP care permite încărcarea și descărcarea modelului de cultură a pielii și, în același timp, permite aplicarea nanoparticulelor încărcate pentru monitorizarea în timp real a procesului de administrare in vitro a medicamentului.*

În cadrul **Activității A2.1** s-a realizat proiectarea și fabricarea suportului culturii celulare. Suportul realizat este constituit dintr-un inel PDMS (polidimetilsiloxan) și o membrană poroasă PDMS proiectat și fabricată pentru menținerea viabilității celulare. Pentru membrană a fost utilizat un cauciuc siliconic lichid curabil UV / UV-PDMS. Au fost testate diferite dimensiuni ale porilor și grosimi membranei.

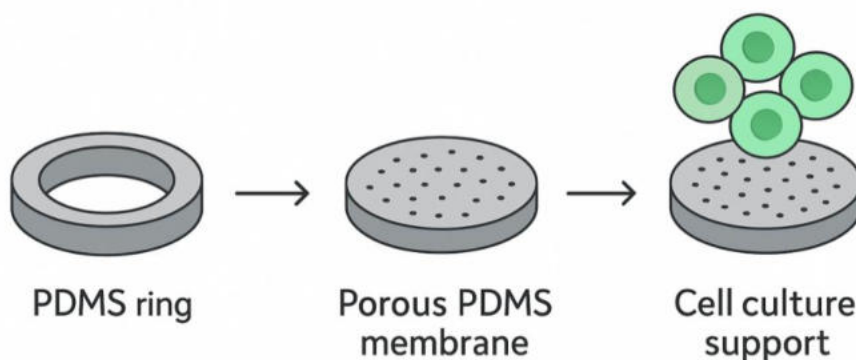


Fig. 1. Reprezentare schematică a suportului realizat pentru cultivarea celulelor

A fost proiectat și realizat un sistem de susținere alcătuit dintr-un inel din PDMS și o membrană poroasă tot din PDMS, cu dimensiuni ale porilor cuprinse între 1 și 10 μm și grosimi ale membranelor de aproximativ 10–50 μm . Membranele obținute au fost funcționalizate prin

imobilizarea colagenului de tip I sau de tip IV, urmată de reticulare covalentă, în vederea asigurării unei adeziuni stabile și de lungă durată a fibroblastelor la suprafața de cultură.

Reticularea colagenului a condus la o îmbunătățire semnificativă a atașării celulare, a răspândirii morfologice și a stabilității pe termen lung a culturilor (>7 zile). În urma evaluărilor biologice, fibroblastele au prezentat cea mai ridicată viabilitate și capacitate de proliferare pe membrane cu parametri intermediari, respectiv grosimi de aproximativ 25 μm și pori de circa 5 μm. Comparativ între cele două tipuri de colagen utilizate, colagenul de tip IV a asigurat o adeziune ușor superioară și o maturizare mai eficientă a punctelor de adeziune focală față de colagenul de tip I, confirmând astfel avantajele sale în aplicațiile de tip *Skin-on-Chip*.

În cadrul **Activității A2.2** a fost realizată cu succes însămânțarea fibroblastelor dermice umane (HDF) pe schele poroase inerte, în vederea obținerii echivalenților dermici complet umani. Au fost utilizate schele cu o porozitate de aproximativ 80%, selectată pentru a asigura un echilibru optim între difuzia nutrienților, eliminarea metaboliților și ancorarea eficientă a celulelor. Înainte de însămânțare, schelele au fost pretratate cu etanol pentru a le conferi caracter hidrofîl, facilitând astfel penetrarea suspensiei celulare în structura poroasă, urmată de două spălări succesive cu soluție tampon fosfat (PBS) în vederea îndepărtării reziduurilor.

Însămânțarea celulară s-a realizat utilizând un număr de $1,0 \times 10^6$ fibroblaste dermice umane per schelă, suspendate în 100 μL mediu specific de creștere pentru fibroblaste (FGM). După aplicarea suspensiei celulare, probele au fost incubate în condiții standard de cultură (37 °C, 5% CO₂, atmosferă umidificată), pentru a permite atașarea, migrarea și proliferarea celulelor în interiorul matricei poroase.

În urma procesului de cultură, s-au obținut sferoizi de fibroblaste dermice umane (HDF spheroids), care au fost menținuți în mediu FGM pe o perioadă de 7 zile. Pe durata acestei etape, fibroblastele au prezentat o bună viabilitate, capacitate de auto-organizare și proliferare tridimensională, conducând la formarea unor structuri celulare compacte și stabile. Aceste echivalente dermice constituie un suport biologic adecvat pentru etapele ulterioare de co-cultură și de reconstrucție epidermică în cadrul platformei *Skin-on-Chip*, reprezentând un rezultat experimental esențial pentru validarea arhitecturii dermice a modelului biomimetic.

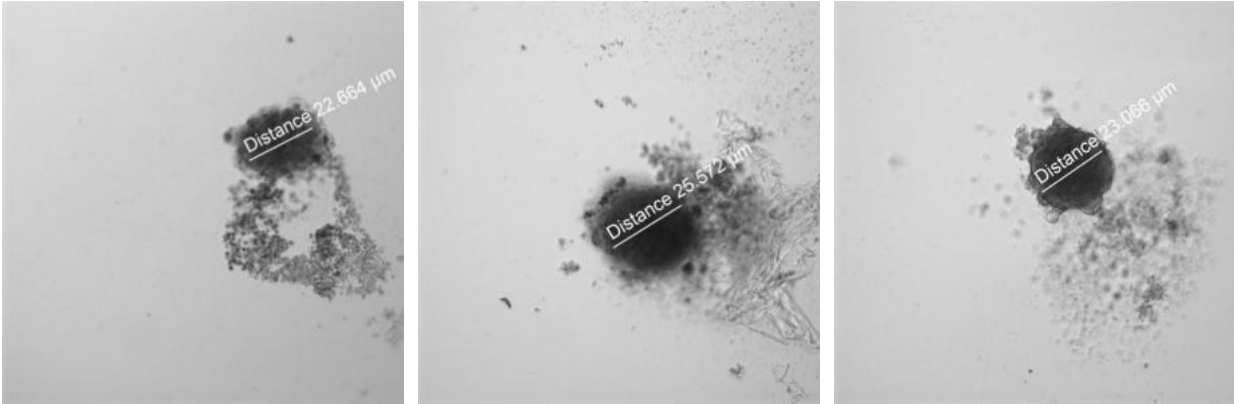


Fig. 2. Activitatea de însămânțare a fibroblastelor dermice umane pe schele poroase inerte a fost realizată cu succes, conducând la obținerea unor echivalenți dermici tridimensionali stabili, cu bună viabilitate și capacitate de auto-organizare. Formarea sferoizilor HDF și menținerea acestora timp de 7 zile în condiții standard de cultură confirmă compatibilitatea schelelor utilizate cu aplicațiile de inginerie tisulară și validarea protocolului de lucru. Rezultatele obținute demonstrează fezabilitatea utilizării acestor echivalenți dermici ca suport biologic pentru etapele ulterioare de reconstrucție epidermică și integrare în platforma *SoC*.

În cadrul **Activității A2.3** a fost realizată evaluarea biologică a culturilor celulare obținute, prin determinarea viabilității acestora și a integrității barierei celulare formate. Viabilitatea celulară a fost analizată utilizând testul Live/Dead, aplicat pe o perioadă de până la 7 zile de cultură, pentru a monitoriza dinamica supraviețuirii celulare în timp. Testul a permis diferențierea celulelor viabile de cele neviabile prin marcaj fluorescent specific, oferind informații calitative și cantitative asupra stării biologice a culturilor.

Rezultatele testului Live/Dead au evidențiat o viabilitate celulară ridicată pe întreaga durată a experimentului, cu valori de peste 90% în primele 48 de ore, indicând o bună adaptare a celulelor la condițiile de cultură și o compatibilitate crescută a suportului utilizat cu structurile celulare formate. Distribuția uniformă a celulelor viabile și absența unui număr semnificativ de celule moarte confirmă stabilitatea sistemului biologic în condiții experimentale controlate.

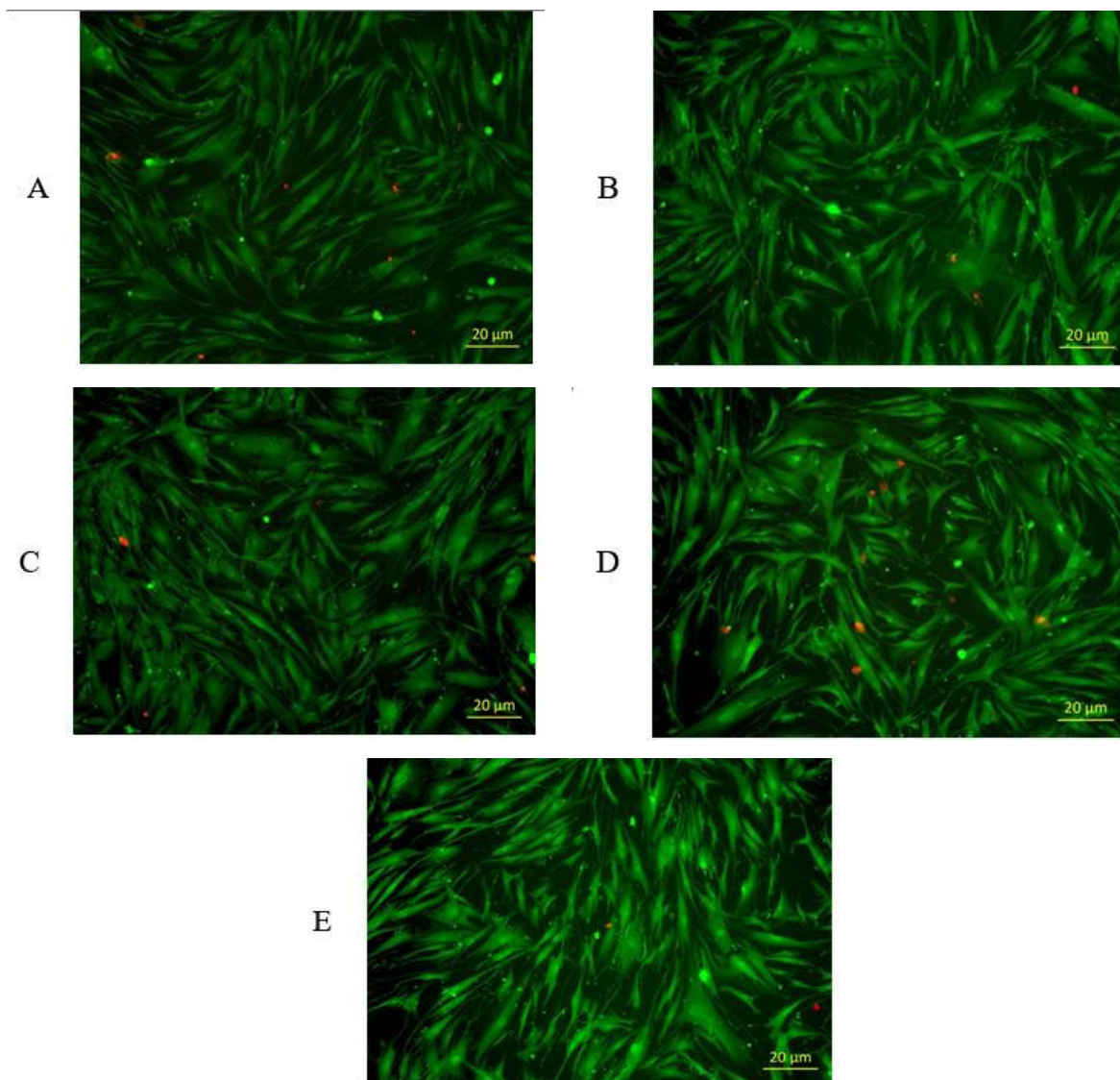


Fig. 3. Celule viabile HDF la microscopie cu fluorescență - test Live/Dead folosind calceină și EthD-1

În paralel, a fost evaluată integritatea barierei celulare prin măsurarea rezistenței electrice transepiteliale (TEER), la intervale de timp bine definite. Valorile TEER au evidențiat o creștere progresivă în timp, ceea ce reflectă formarea treptată și menținerea unei bariere celulare funcționale și intacte. Această evoluție indică stabilirea contactelor intercelulare și consolidarea joncțiunilor strânse dintre celule, parametri esențiali pentru validarea unui model biomimetic de tip *Skin-on-Chip*. Corelarea rezultatelor obținute prin testul Live/Dead cu valorile TEER confirmă faptul că structura celulară formată prezintă atât o viabilitate biologică ridicată, cât și proprietăți funcționale adecvate, esențiale pentru utilizarea ulterioară în teste de permeabilitate și evaluări farmacologice.

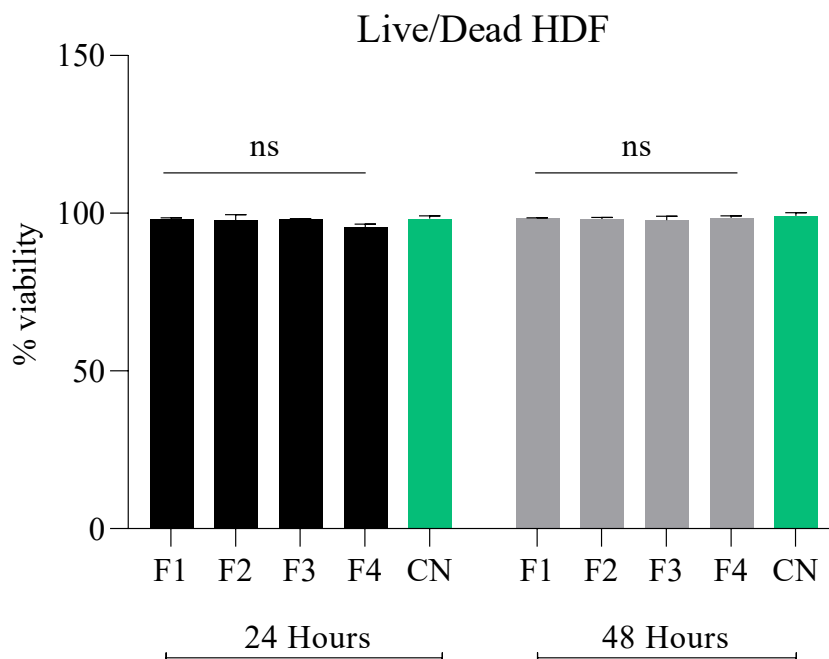


Fig. 4. Evaluarea viabilității (%) pe fibroblaste dermice umane utilizând testul Live/Dead cu calceină și EthD-1, la 24 și 48 de ore; CN = celule cultivate normale; ns = ne semnificativ statistic.

Activitatea A2.3 a demonstrat că sistemul celular dezvoltat prezintă o viabilitate ridicată și o capacitate adecvată de formare a unei bariere funcționale, așa cum este confirmat prin rezultatele testelor Live/Dead și TEER. Menținerea unei viabilități de peste 90% și creșterea progresivă a rezistenței electrice transepiteliale validează stabilitatea și funcționalitatea modelului biologic obținut. Aceste rezultate confirmă adecvarea sistemului pentru integrarea în platforma *Skin-on-Chip* și pentru utilizarea în etapele ulterioare de testare a transferului transdermic al substanțelor bioactive.

În cadrul **Activității A2.3** a fost realizată proiectarea conceptuală și tehnică a cipului microfluidic destinat integrării în platforma *Skin-on-Chip*, utilizând mediul de proiectare asistată de calculator **SolidWorks**. Modelarea tridimensională a permis definirea arhitecturii generale a cipului, incluzând geometria canalelor microfluidice, compartimentarea zonelor apicale și bazale, zonele de însămânțare celulară și punctele de acces pentru perfuzie și recoltare. Proiectarea a avut ca obiectiv asigurarea unui control precis al fluxurilor, o distribuție uniformă a mediului de cultură și menținerea condițiilor fiziologice necesare formării și funcționării barierei celulare.

În paralel, a fost realizată proiectarea senzorului TEER (*Trans-Epithelial Electrical Resistance*), în mod similar cu abordarea utilizată în activitatea 1.4, având ca scop monitorizarea în timp real a integrității barierei celulare. Designul senzorului a inclus configurația electrozilor, poziționarea acestora față de stratul celular și compatibilitatea cu structura cipului microfluidic. Au fost luate în considerare criteriile esențiale precum stabilitatea electrică, biocompatibilitatea materialelor, precizia măsurătorilor și posibilitatea integrării funcționale în ansamblul microfluidic.

Prin realizarea acestor etape de proiectare, a fost definit un prototip virtual complet al platformei microfluidice cu integrare de senzor TEER, care constituie baza tehnologică pentru fazele ulterioare de fabricație, testare electrică și validare biologică. Această activitate asigură transferul de la etapa de concepție la cea de implementare experimentală a sistemului *Skin-on-Chip*.

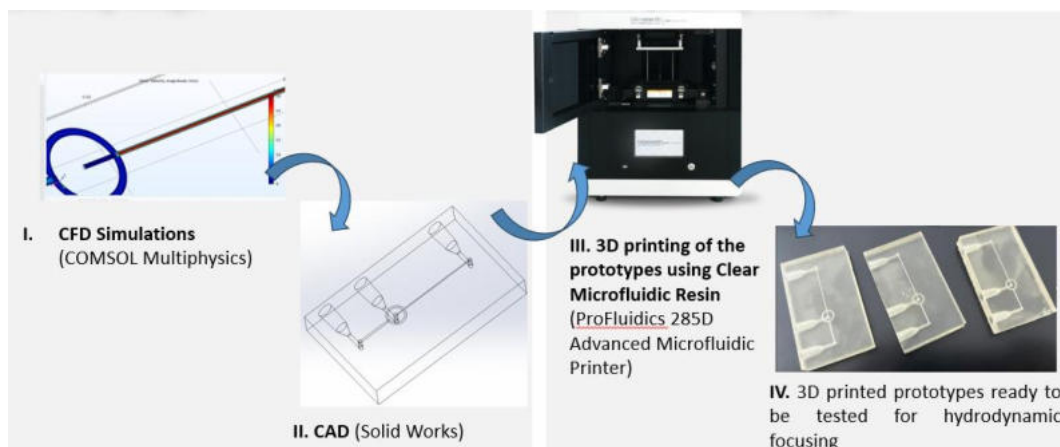


Fig. 5. (a) Simulări CFD pentru determinarea geometriei și dimensiunilor microcanalelor utilizate în procesul de focalizare hidrodinamică. (b) proiectarea dispozitivului de focalizare hidrodinamică în SolidWorks, (c) printarea 3D a prototipurilor de focalizare hidrodinamică a fost realizată utilizând imprimanta ProFluidics 285D, (d) În etapa finală au putut fi printate prototipuri de focalizare hidrodinamică cu microcanale de diametre de până la 240 μm .

În cadrul **Activității A2.4** a fost demarat procesul de realizare a prototipului cipului microfluidic proiectat anterior, utilizând tehnologia de imprimare 3D prin stereolitografie (SLA), pe o imprimantă dedicată fabricării dispozitivelor microfluidice de tip **Cadworks** (Figura 5). Această tehnologie a fost aleasă datorită rezoluției ridicate și capacității de a reproduce cu acuratețe

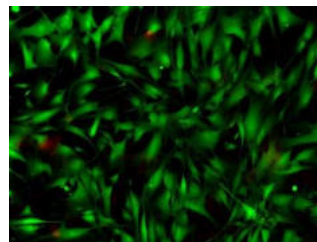
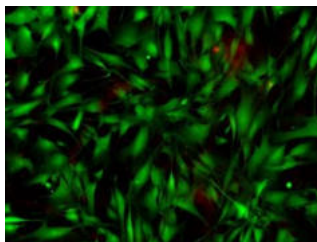
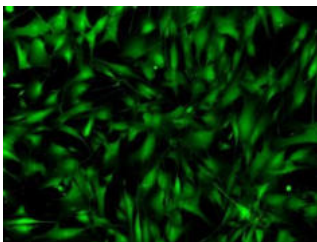
geometria fină a canalelor microfluidice și a compartimentelor funcționale necesare pentru integrarea culturilor celulare și a senzorului TEER.

În această etapă au fost utilizate modelele CAD realizate în cadrul activității A2.3, care au fost adaptate pentru procesul de fabricație prin SLA, ținând cont de constrângerile tehnologice specifice (dimensiuni minime ale canalelor, toleranțe, orientare la imprimare). Au fost efectuate teste preliminare de imprimare pentru validarea fidelității geometrice a structurilor și pentru optimizarea parametrilor tehnologici (rezoluție, timp de expunere, post-polimerizare), în vederea obținerii unor canale continue, etanșe și cu suprafețe interioare adecvate utilizării biologice.

Conform planului de lucru, anumite componente ale platformei urmează să fie realizate ulterior și prin tehnologii complementare, utilizând suporturi din sticlă și/sau siliciu, în vederea asigurării unei stabilități mecanice și chimice superioare, precum și a unei compatibilități optime cu măsurătorile microscopice și electrice. În paralel, a fost avută în vedere compatibilizarea prototipului imprimat 3D cu integrarea senzorului TEER proiectat, astfel încât ansamblul final să permită atât perfuzia controlată a mediilor de cultură, cât și monitorizarea în timp real a integrității barierei celulare. La momentul raportării, prototipul se află în stadiu de realizare și optimizare tehnologică, fiind în curs etapele de validare dimensională, verificare a etanșeității canalelor și adaptare a designului pentru integrarea componentelor biologice și a senzorilor.

În cadrul **Activității A2.5** a fost realizată testarea biologică a prototipului SoCP utilizând nanoparticulele selectate anterior, aplicate pe modelul FTS. Testarea a fost concepută pentru a evalua compatibilitatea biologică a sistemului și comportamentul acestuia în condiții care imită mediul biologic, printr-un protocol similar celui aplicat în cadrul Activității A2.3.

Viabilitatea celulară a fost evaluată prin teste Live/Dead, efectuate pe intervale de timp predefinite, pentru a monitoriza dinamica supraviețuirii celulare în prezența nanoparticulelor. Testul a permis diferențierea celulelor viabile de cele neviabile prin marcaje fluorescente specifice, oferind informații atât calitative, cât și cantitative asupra stării biologice a culturilor.



a) HDF viable cells without treatment - 10X Live/Dead Assay using Calcein and EthD-1 b) HDF cells treated with V2T7 - 10X Live/Dead Assay using Calcein and EthD-1 c) HDF cells treated with V2CET7 - 10X Live/Dead Assay using Calcein and EthD-1

Fig. 7. Viabilitatea celulară evaluată prin testul Live/Dead, efectuat la intervale de timp predefinite, pentru a monitoriza dinamica supraviețuirii celulelor în prezența nanoparticulelor

În paralel, caracterizarea nanoparticulelor a fost realizată prin măsurători DLS (Dynamic Light Scattering), pentru a determina dimensiunea și distribuția acestora în mediul de cultură, parametri importanți în evaluarea interacțiunii cu celulele și a eficienței de livrare a canabidiolului.

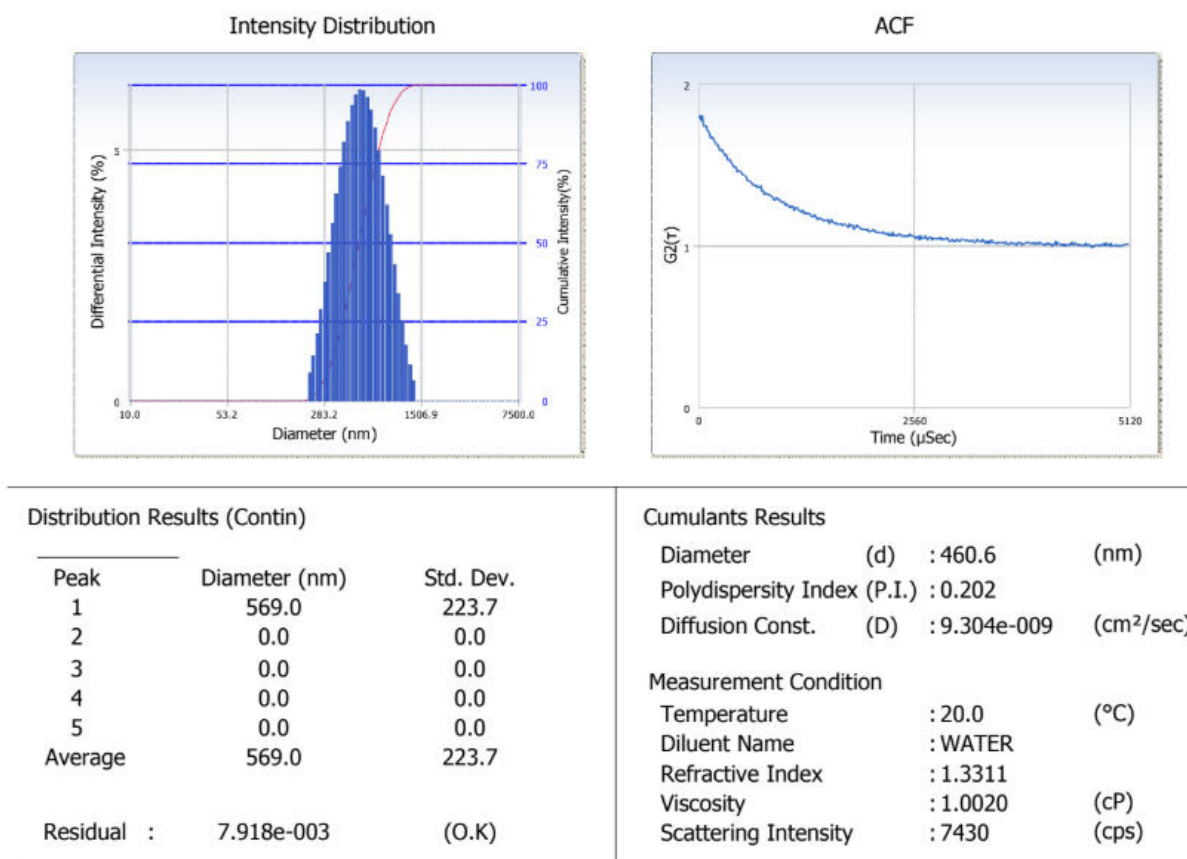


Fig. 8. Evaluarea DLS a dimensiunii și distribuției transethosomelor obținuți cu ajutorul unui chip cu focusare hidrodinamică. Această analiză a permis determinarea mărimii medii, polidispersității și stabilității particulelor în mediu lichid, oferind informații esențiale pentru caracterizarea fizico-chimică a sistemului de livrare a moleculelor active. Se poate observa monodispersia fazei organice cu faza apoasă.

De asemenea, s-a monitorizat prin măsurători HPLC rata de eliberare a canabidiolului în mediul de cultură, pentru a analiza profilul de eliberare și biodisponibilitatea compusului activ.

Rezultatele obținute au fost comparate între modelele statice și cele dinamice, evidențiind influența condițiilor experimentale asupra viabilității celulare și asupra performanței prototipului SoCP. Analiza comparativă a demonstrat că prototipul asigură menținerea unei viabilități ridicate

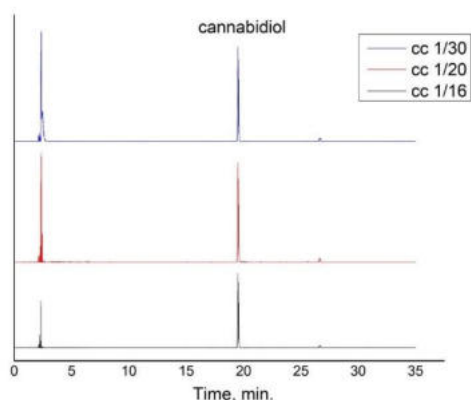


Fig. 9. Evaluarea HPLC a ratei de eliberare a canabidiolului din in mediul celular

a celulelor, distribuție uniformă a acestora și eliberare controlată a canabidiolului, confirmând compatibilitatea biologică și funcționalitatea sistemului în cadrul modelului *Skin-on-Chip*.

În cadrul Obiectivului O3 a fost realizată optimizarea transportatorului de tip nanoparticulă și validarea eficacității acestuia pentru administrarea transdermică a diferitelor substanțe active, utilizând modelul de piele de grosime completă (FTS). Acest obiectiv a urmărit

evaluarea capacității de penetrare, a transferului de masă și a eficienței de absorbție a compușilor chimici în mediile de cultură celulară, în condiții controlate. Testările au fost corelate cu datele obținute anterior privind stabilitatea și biocompatibilitatea nanosistemelor dezvoltate.

În cadrul **Activității A3.1** au fost testate nanoparticulele optimizate pe modelul de piele de grosime completă (FTS), la mai multe concentrații stabilite conform studiilor similare din literatura de specialitate. Nanosistemele au fost aplicate topic pe suprafața modelului FTS, iar difuzia acestora a fost monitorizată prin microscopie confocală – de fluorescență.

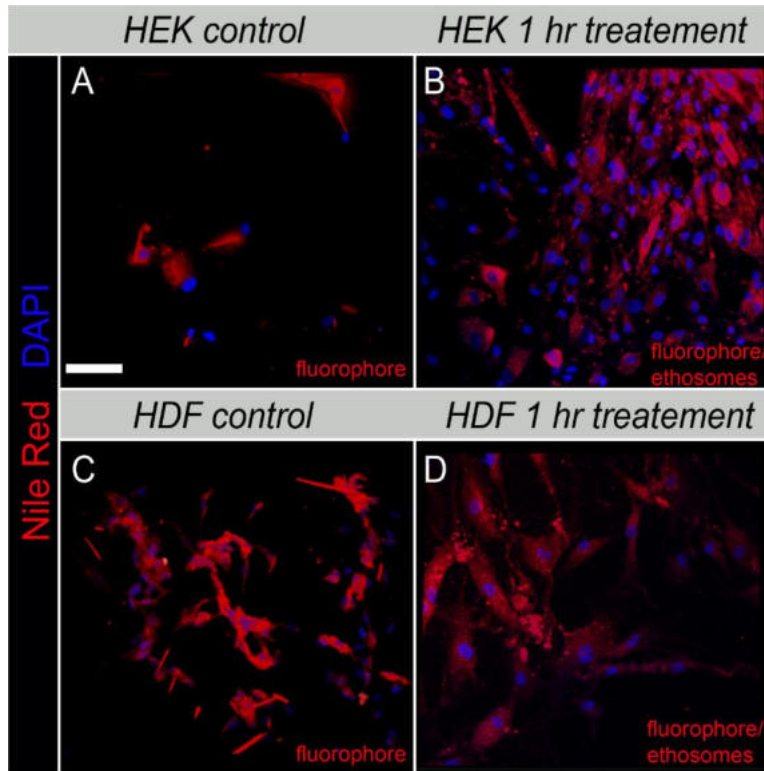


Fig. 10. Analiza absorbției de fluorofori în celulele HEK și HDF după tratamentul cu formulări lipidice. Celulele HEK (A-B) și HDF (C-D) au fost incubate timp de 1 oră fie cu Nile Red liber (control; A, C), fie cu lipide conținând Nile Red și canabidiol (tratament; B, D). Celulele au fost fixate și colorate cu DAPI (albastru) pentru a vizualiza nucleii. Nile Red (roșu) a fost utilizat ca fluorofor și marker lipidic. O fluorescență citoplasmatică crescută a fost observată în celulele tratate, indicând o absorbție crescută prin administrarea soluțiilor lipidice.

Rezultatele obținute au evidențiat capacitatea nanoparticulelor de a pătrunde progresiv prin straturile modelului cutanat, cu o dependență clară de concentrația aplicată. Analizele histologice au arătat o distribuție uniformă a particulelor în stratul epidermic, cu penetrare controlată către compartimentul dermic. Creșterea concentrației a condus la o adâncime mai mare de difuzie, fără a fi observate modificări structurale majore ale țesutului.

În cadrul **Activității A3.2** a fost investigat transferul de masă al compusului chimic în modelul FTS, atât din punct de vedere calitativ, cât și cantitativ, precum și stabilitatea microbiologică a sistemului. Profilul de difuzie al medicamentului a fost analizat prin microscopie fluorescentă, rezultatele prezentate în activitatea A3.1 fiind corelate cu determinările realizate prin HPLC.

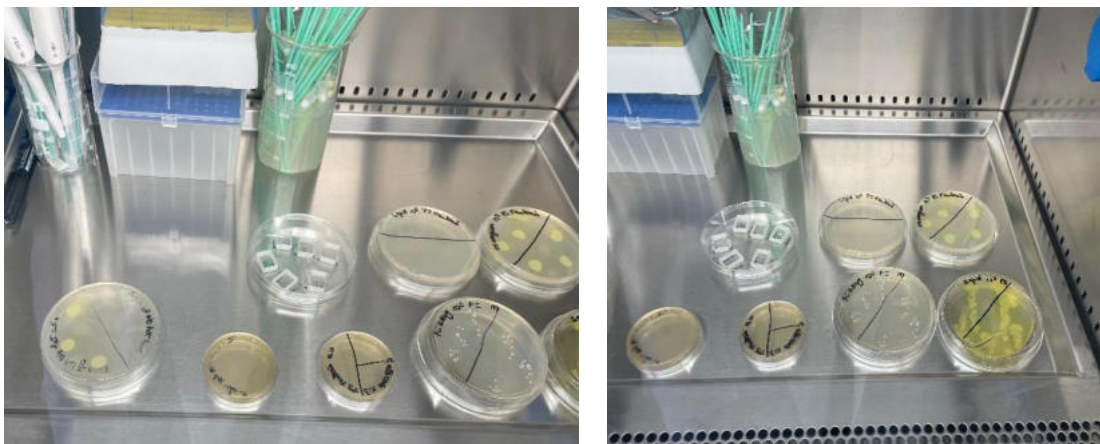


Fig. 11. Un instrument valoros utilizat în determinarea echilibrului dintre eficacitate și siguranță, în acest caz, se bazează pe metode de evaluare a activității antimicrobiene și a aderenței microorganismelor la membranele obținute. Aceste evaluări sunt efectuate pentru a stabili siguranța utilizării biomedicale a materialelor sau pentru a verifica eficiența utilizării lor în limitarea infecțiilor sau în timpul proceselor de decontaminare. Dispozitivele medicale care încorporează agenți sau materiale cu efect antimicrobian se caracterizează prin capacitatea de a limita semnificativ sau chiar suprima dezvoltarea microorganismelor pe suprafața și/sau în volumul lor, în condiții adecvate de temperatură, compoziția mediului gazos și aportul de nutrienți. Activitatea lor antimicrobiană propagată depinde și de diametrul fibrelor, hidrofilicitatea suprafeței, precum și de rugozitatea și rigiditatea acestora, toate aspectele trebuind luate în considerare, aspecte despre care se știe că au o corelație directă în afectarea capacității bacteriilor de a se atașa și prolifera în cadrul rețelelor fibroase. Reducerile microbiene procentuale de peste 50% sunt considerate optime pentru aplicația preconizată, cu condiția ca biocompatibilitatea fibrelor în cauză să fie certă.

Rezultatele obținute au confirmat prezența progresivă a semnalului fluorescent în profunzimea modelului de cultură celulară, indicând un transfer eficient al compusului prin structura pielii biomimetice. Analiza cantitativă a intensității semnalului a arătat o creștere dependentă de timp a cantității de substanță transportată. Testele de stabilitate microbiologică au evidențiat menținerea integrității nanosistemului în intervalul de temperatură fiziologic, fără degradări semnificative sau pierderi de eficiență a eliberării – indicând că modelul nu favorizează creșterea microorganismelor, având activitate selectivă pentru celulele HDF și HEK.

În cadrul **Activității A3.3** a fost determinat nivelul cantitativ al medicamentului în mediile de cultură celulară recoltate din compartimentul bazal al sistemului FTS. Mediile au fost analizate la intervale de timp prestabilite, utilizând metode analitice specifice pentru dozarea compușilor chimici.

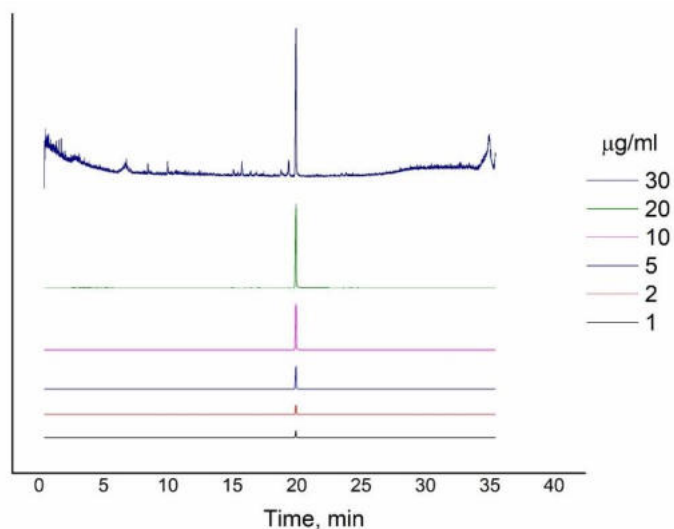


Fig. 12. Evaluarea HPLC a ratei de eliberare a canabidiolului

Rezultatele obținute prin analiza HPLC au arătat o creștere progresivă a concentrației medicamentului în mediul de cultură, ceea ce confirmă permeabilitatea transdermică a modelului și eficiența eliberării controlate din nanosistem. Valorile obținute au fost corelate cu datele de difuzie fluorescentă, confirmând concordanța dintre transferul structural și absorbția efectivă a substanței active.

Concluzii

În cadrul etapei raportate (01.07.2025 – 30.11.2025), proiectul a înregistrat progrese semnificative în realizarea platformei tip *Skin-on-Chip* pentru testarea *in vitro* a nanoparticulelor.

S-a realizat cu succes proiectarea și fabricarea prototipului incubator-SoCP, care permite manipularea controlată a modelului de cultură a pielii, aplicarea nanoparticulelor încărcate și monitorizarea în timp real a procesului de administrare *in vitro* a medicamentului. Suportul celular, realizat din PDMS și membrană poroasă funcționalizată cu collagen, a demonstrat o bună compatibilitate biologică, favorizând atașarea, proliferarea și auto-organizarea fibroblastelor dermice umane în structuri tridimensionale stabile, adecvate pentru reconstrucția dermică și integrarea ulterioară a epidermului.

Evaluările biologice, realizate prin testele Live/Dead și măsurarea rezistenței electrice transepiteliale (TEER), au confirmat formarea unei bariere celulare funcționale și menținerea unei viabilități ridicate (>90%) pe durata experimentului, indicând stabilitatea și compatibilitatea sistemului cu condițiile de cultură dinamice.

Proiectarea tridimensională a cipului microfluidic și a senzorului TEER, urmată de realizarea prototipului prin imprimare 3D SLA, a permis obținerea unor canale microfluidice precise, etanșe și compatibile cu integrarea culturilor celulare și a măsurătorilor electrice, asigurând astfel un control optim al fluxurilor și condițiilor fiziologice.

Testarea biologică a prototipului SoCP, prin aplicarea nanoparticulelor transethazomale încărcate cu canabidiol, a demonstrat menținerea unei viabilități ridicate a celulelor, distribuție uniformă a acestora și eliberare controlată a compusului activ. Caracterizarea fizico-chimică a nanoparticulelor prin DLS și monitorizarea eliberării CBD prin HPLC au confirmat stabilitatea sistemului și eficiența livrării moleculei active.

Compararea performanțelor între modelele statice și dinamice a evidențiat influența pozitivă a condițiilor microfluidice asupra viabilității celulare și a profilului de eliberare al compusului activ, demonstrând funcționalitatea și compatibilitatea biologică a prototipului SoCP în cadrul modelului Skin-on-Chip.

Aceste rezultate confirmă fezabilitatea continuării dezvoltării platformei microfluidice integrate cu senzor TEER, oferind o bază solidă pentru testele ulterioare de permeabilitate transdermică și evaluarea farmacologică a substanțelor bioactive.

Astfel, platforma dezvoltată reprezintă un progres major în direcția alternativelor etice și eficiente pentru testarea preclinică a substanțelor bioactive, punând bazele unor modele experimentale robuste cu aplicații transversale în cercetare și industrie.

În concluzie, rezultatele obținute până în prezent confirmă că platforma Skin-on-Chip dezvoltată combină cu succes arhitectura tridimensională și funcționalitatea biologică a pielii umane cu integrarea nanosistemelor pentru livrarea controlată a substanțelor active, oferind un sistem reproductibil, compatibil biologic și funcțional. În plus, etapele de optimizare a transportatorului de tip nanoparticulă și evaluarea eficacității acestuia cu diferite medicamente, analizând distribuția, adâncimea de penetrare și absorbția compusului activ în modelul FTS, precum și monitorizarea stabilității și biodisponibilității, ne-au ghidat dezvoltarea sistemului și orientarea acestuia spre aplicații farmacologice și terapeutice.

Diseminarea rezultatelor

1. Articol tip recenzie cu titlul *The good, the bad, and the ugly: skin-on-chip* de către autorii Mina Ghiță-Răileanu, Georgeta-Luminița Gheorghiu, Bianca Tihăuan, GrațIELA Grădișteanu Pârcălăbioru, Gabriela Cioca, Florina S. Iliescu, Ciprian Iliescu – publicat în jurnalul *APL Bioengineering*, **IF 6.02**;

2. Articol tip recenzie cu titlul *Cannabidiol – friend or foe?* de către autorii Bianca – Maria Tihăuan, Onisei Tatiana, Daniel Gună, Walter Sloothberg, Ciprian Iliescu, Mariana – Carmen Chifiriuc – publicat în jurnalul *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **IF 4.3**;
3. Prezentare orală tip poster cu titlul *Beyond the Surface: How the Transdermal Delivery of Cannabidiol Can Unlock New Antimicrobial Sustained Effects* de către autorii Bianca – Maria Tihăuan, Ciprian Iliescu, Grațiela Grădișteanu Pârcălăbioru, Florina S. Iliescu – prezentată la conferința internațională ESCMID în cadrul secțiunii ”*New antibacterial agents, PK/PD & Stewardship - Drug discovery and new compounds mechanisms of action & spectrum, preclinical data & basic pharmacology (incl drug design, investigational and non-traditional therapeutics)*”, 11-15.05.2025, Viena, Austria;
4. Prezentare orală a lucrării ”*Efecte Antimicrobiene Susținute Ale Combinației Sinergice dintre Canabidiol și Eritromicină*” în cadrul Secțiunii de Biologie, la Conferința Științifică Națională de Primăvară a Academiei Oamenilor de Știință din România, cu tematica „Știința și diplomația culturală – factori ai cooperării internaționale”, 23-24 mai 2024, București, Romania.
5. Prezentare orală a lucrării ”*CBD-loaded deformable lipid vesicles for enhanced antimicrobial therapy against S. epidermidis*” în cadrul celei de-a 4-a ediții a Conferinței Internaționale de Bioinginerie și Știința Polimerilor – BPC, 2-5 iunie 2025, Brașov, România.
6. Articol tip *original research* cu titlul ”*Novel Scar-Preventive Hydro-Emulsion with CBD Encapsulated in Lipid Carriers*” de către autorii **Bianca Tihăuan**, Madalina Axinie, Luminița Măruțescu, Adrian Pîrnău, Maria Miclaus, Xenia Filip, Alina Perișoară, Cristina Chircov, Georgiana Dolete, Grațiela Gradisteanu-Pircalabioru, Ciprian Iliescu, Mariana Carmen Chifiriuc– în curs de publicare în jurnalul *Advances in Wound Care*, **IF 5.6**.
7. Articol tip recenzie cu titlul ”*Navigating Challenges In Drug Testing And Disease Modeling: 3d Skin Organoids Vs. 2d Cell Lines*” de către autorii Elena RADU, Laura-Elena ANDREI, Ana-Maria ZAMFIRESCU, Grațiela Grădișteanu-PÎRCĂLĂBIORU, Ming NI, Yi ZHANG, Ciprian ILIESCU, **Bianca-Maria TIHĂUAN** – în curs de publicare în *Annals – Series on Biology*.
8. Articol tip *original research* cu titlul ”*Microfluidic Production and Characterization of Transethosomes via Hydrodynamic Flow-Focusing for Skin-on-a-Chip Applications*” de către autorii **Bianca-Maria TIHĂUAN**, **Daniel Măriuță**, Elena RADU, Laura-Elena ANDREI, Ana-Maria ZAMFIRESCU, Ciprian ILIESCU – în curs de publicare în *Biofabrication*, **IF 8.2**.
9. Prezentare orală a lucrării ”*QC in pharma and MD industry*” în cadrul Secțiunii de Biologie, de către autorii Elena Radu, **Bianca-Maria Tihăuan**, Laura-Elena Andrei, Grațiela Grădișteanu-

Pîrcălăbioru, Florina-Silvia Iliescu, Ciprian Iliescu, la Conferința Științifică Națională de Toamnă a Academiei Oamenilor de Știință din România, cu tematica „Știință, cunoaștere, creativitate, spiritualitate”, 17-19 Septembrie, 2025, Durău, Piatra Neamț.

10. Prezentare orala tip poster cu titlul *Exploring Cannabidiol as a Resistance-Modifying Agent in Daptomycin-Non-Susceptible MRSA* de către autorii L.E. Andrei, E. Radu, G. Gradisteanu Pircalabioru, C. Iliescu, **B.M. Tihauan** – transmisă spre evaluare la conferința internațională ESCMID în cadrul secțiunii ”*New antibacterial agents, PK/PD & Stewardship - Drug discovery and new compounds mechanisms of action & spectrum, preclinical data & basic pharmacology (incl drug design, investigational and non-traditional therapeutics)*”, care va avea loc în Munich, Germania, 17-21 Aprilie 2026.

Surse bibliografice

- [1] Y. Gilaberte, L. Prieto-Torres, I. Pastushenko, and Á. Juarranz, “Anatomy and Function of the Skin,” *Nanosci. Dermatology*, vol. 102, no. 32, pp. 1–14, 2016, doi: 10.1016/B978-0-12-802926-8.00001-X.
- [2] M. Ghiță-Răileanu *et al.*, “Skin-on-chip: Quo vadis?,” *APL Bioeng.*, vol. 9, no. 4, Dec. 2025, doi: 10.1063/5.0268706.
- [3] I. Risueño, L. Valencia, J. L. Jorcano, and D. Velasco, “Skin-on-a-chip models: General overview and future perspectives,” *APL Bioeng.*, vol. 5, no. 3, p. 30901, Sep. 2021, doi: 10.1063/5.0046376.
- [4] S. Moon, D. H. Kim, and J. U. Shin, “In Vitro Models Mimicking Immune Response in the Skin,” *Yonsei Med. J.*, vol. 62, no. 11, p. 969, Nov. 2021, doi: 10.3349/YMJ.2021.62.11.969.
- [5] S. J. Phang *et al.*, “Advancements in Extracellular Matrix-Based Biomaterials and Biofabrication of 3D Organotypic Skin Models,” *ACS Biomater. Sci. Eng.*, vol. 8, no. 8, pp. 3220–3241, Aug. 2022, doi: 10.1021/ACSBBIOMATERIALS.2C00342/ASSET/IMAGES/MEDIUM/AB2C00342_0008.GIF.
- [6] G. Sriram *et al.*, “Full-thickness human skin-on-chip with enhanced epidermal morphogenesis and barrier function,” *Mater. Today*, vol. 21, no. 4, pp. 326–340, May 2018, doi: 10.1016/J.MATTOD.2017.11.002.
- [7] S. C. Wistner, L. Rashad, and G. Slaughter, “Advances in tissue engineering and biofabrication for in vitro skin modeling,” *Bioprinting (Amsterdam, Netherlands)*, vol. 35, p. e00306, Nov. 2023, doi: 10.1016/J.BPRINT.2023.E00306.
- [8] I. Risueño, L. Valencia, J. L. Jorcano, and D. Velasco, “Skin-on-a-chip models: General overview and future perspectives,” *APL Bioeng.*, vol. 5, no. 3, p. 030901, Sep. 2021, doi: 10.1063/5.0046376.

Preambul

Pielea reprezintă cel mai extins organ al corpului uman și constituie prima linie de apărare împotriva mediului extern, îndeplinind simultan funcții esențiale de protecție, termoreglare, percepție senzorială și metabolizare. Caracteristicile sale structurale și funcționale unice îi conferă permeabilitate față de aer, căldură, fluide și molecule cu masă moleculară mică, făcând posibil transferul substanțelor prin trei căi principale: intracelular, prin spațiile dintre corneocite; transcelular, prin corneocite și matricea lipidică înconjurătoare; și prin anexe cutanate, precum glandele sudoripare și foliculii de păr. Aceste particularități au deschis perspective importante pentru administrarea transdermică a medicamentelor, o cale terapeutică ce oferă avantaje semnificative față de administrarea orală sau parenterală, prin creșterea complianței pacientului, evitarea metabolismului de prim pasaj hepatic, reducerea dozelor sistemice și diminuarea efectelor adverse [1].

Administrarea transdermică este orientată preponderent către obținerea unor efecte locale controlate, dar poate susține și eliberarea sistemică a unor substanțe active, în funcție de proprietățile fizico-chimice ale moleculelor și de integritatea barierei cutanate. În acest context, evaluarea corectă a permeabilității, absorbției și siguranței substanțelor administrate topic necesită utilizarea unor modele experimentale avansate care să reproducă fidel structura și funcționalitatea pielii umane. Limitările etice, metabolice și predictive ale testării pe animale au determinat o tranziție accelerată către dezvoltarea de sisteme alternative *in vitro*, capabile să asigure rezultate reproductibile și relevante clinic. Astfel, platformele biomimetice de tip *Skin-on-Chip* (SoC) s-au impus ca o tehnologie emergentă de referință în testarea preclinică modernă [2], [3].

Din rapoartele anterioare s-a demonstrat că platformele SoC reproduc într-o măsură ridicată arhitectura tridimensională și funcționalitatea pielii umane prin integrarea controlată a componentelor epidermice, dermice și vasculare într-un mediu microfluidic. Performanța acestor platforme este esențial influențată de sursa celulară, care poate fi autogenă, alogenică sau xenogenă, fiecare având avantaje și limitări specifice în ceea ce privește relevanța fiziologică, variabilitatea genetică și riscul de reacții imune [4]. Cele mai frecvent utilizate tipuri de celule în aplicațiile SoC sunt celulele primare umane, liniile celulare standardizate și celulele stem pluripotente induse (iPSC). Utilizarea celulelor primare, precum keratinocitele și fibroblastele