



UNIVERSITATEA DIN BUCURESTI

FACULTATEA DE BIOLOGIE

Proiect PCCE248/2010

NOI CONCEPTE SI STRATEGII PENTRU DEZVOLTAREA CUNOASTERII UNOR NOI STRUCTURI BIOCOMPATIBILE IN BIOINGINERIE

DEPARTAMENTUL DE BIOCHIMIE SI BIOLOGIE MOLECULARA

COORDONATOR – P1

Site: www.pcce248.weebly.com

Raport anual de activitate

-2012-

Partenerul P1 și totodată coordonatorul echipei de cercetare a fost implicat în perioada 01.01.2012-05.12.2012 în realizarea următoarelor activități științifice din cadrul **Obiectivului 3-** “*Studiul efectelor cultivării în sistem 3D și a factorilor de creștere asupra diferențierii condrogenice a celulelor stem izolate din țesut adipos (ADAS) în vederea obținerii unor modele de investigare a potențialului lor de regenerare a țesutului cartilajinos*”:

3.3. Evaluarea biocompatibilității *in vitro* a structurilor scaffold 3D elaborate

3.4. Stabilirea numărului de probe și a formei lor de prezentare, în vederea parcurgerii complete în condiții optime a întregului set de teste pentru biocompatibilitate și diferențiere

3.6. Optimizarea metodelor de izolare a celulelor ADAS și de cultivare a lor în sisteme 2D

3.7. Selectarea sistemului de cultivare a celulelor ADAS în vederea diferențierii condrogenice și monitorizarea procesului.

În acord cu planul de realizare, P1 a continuat și dezvoltat **activitatea 3.6 (Optimizarea metodelor de izolare a celulelor ADAS și de cultivare a lor în sisteme 2D)** pe baza lipoaspiratelor primite. Luând în considerare rezultatele obținute prin studiile de senescență și imunofenotipare efectuate în etapa II/2011 a proiectului, cultura primară a fost purificată prin pasaje succesive și studiile ulterioare de biocompatibilitate și diferențiere s-au desfășurat pe celule ADAS aflate în pasajele 3-7. În vederea continuării activității 3.6, s-a urmărit modularea condițiilor de cultivare a celulelor ADAS în sistem 2D în vederea obținerii unei diferențieri adipogenice optime ca eficiență și durată. Pe termen lung, această posibilitate de control/modulare a condițiilor de cultivare a celulelor se dorește a fi adaptată și sistemelor de cultură 3D destinate reconstrucției țesuturilor moi, vizând ca rezultat final un randament crescut al generării *in vivo* de țesut *de novo*. Astfel, au fost utilizate comparativ 4 compoziții diferite de mediu de diferențiere, conform Tabelului 1a din anexa aferentă acestui raport, cu distribuție diferită în timp (Tabel 1b). În urma acestor studii, au fost alese ca și condiții optime pentru cultivarea celulelor ADAS în sistem 2D în vederea diferențierii adipogenice condițiile din protocolul P₂ (Figura 1 din anexa). Optimizarea metodei de cultivare descrisă mai sus a fost valorificată sub forma unui articol ISI: Galateanu B.*, Dinescu S.*, Cimpean A., Dinischiotu A. and Costache M. Modulation of adipogenic conditions for prospective use of hADSCs in adipose tissue engineering, *International Journal of Molecular Sciences*, **2012**, 13(12), 15881-15900. (*autori cu contribuții egale).

Activitatea 3.7 a vizat **selectarea sistemului de cultivare a celulelor ADAS în vederea diferențierii condrogenice și monitorizarea procesului**. Pentru îndeplinirea acestei activități, P1 a

UNIVERSITATEA DIN BUCURESTI FACULTATEA DE BIOLOGIE

testat (i) diferite retete de inducere a procesului de diferentiere celulara pe cale condrogenica si (ii) diferite tipuri de cultura a celulelor- in sistem bidimensional (2D) si in pelet- in vederea identificarii sistemului care sa permita desfasurarea optima a condrogenezei.

- (i) Astfel, P1 a propus 2 compozitii diferite de medii de diferentiere (MD), descrise in Tabelul 2, in care inductorii principali sunt reprezentati de BMP6 si de TGF- β 1. MD2 contine in plus fata de MD1 acid linoleic, prolina si acid ascorbic, factori care conditioneaza favorabil diferentierea celulelor pe cale condrogenica. Retetele MD1 si MD2 au fost testate timp de 28 de zile pe o cultura de celule ADAS si, in paralel, pe o cultura de condrocite umane (control). Momentul aplicarii tratamentului cu MD1/MD2 celulelor ADAS aflate in pasajul 4 este considerat momentul T_0 . In vederea evidentierii gradului de diferentiere condrogenica indus de MD1 fata de MD2, au fost realizate *studii de imunofluorescenta* la 14 si 28 de zile post-inductie, cu evidentierea principalului inductor al condrogenezei- Sox9 (Figura 2b)- si a producerii de matrice extracelulara- proteina Matrilin1 (Figura 2a). In urma studiilor realizate, s-a concluzionat ca MD2 induce mai rapid si mai eficient condrogeneza celulelor ADAS si, de aceea, compozitia MD2 a fost utilizata ulterior pentru continuarea studiului condrogenezei *in vitro*.

Tabelul 2- Compozitia mediilor de diferentiere propuse de P1 in vederea diferentierii celulelor ADAS pe cale condrogenica.

MD1	MD2
BMP-6 500ng/ml* (Invitrogen, PHC7145)	BMP-6 500ng/ml*
TGF- β 1 10 ng/ml (Sigma-Aldrich, T7039)	TGF- β 1 10 ng/ml
DEX 100 nM (Sigma-Aldrich, D4902)	DEX 100 nM
IGF-1 100 ng/ml (Sigma-Aldrich, SRP4121)	IGF-1 100 ng/ml
Insulină 6,25 μ g/m (Sigma-Aldrich, 91077C)	Insulină 6,25 μ g/m
Transferină 6,25 μ g/ml (Sigma-Aldrich, T8158)	Transferină 6,25 μ g/ml
Ac. selenos 6,25 μ g/ml (Sigma-Aldrich, 211176)	Ac. Selenos 6,25 μ g/ml
	Ac. Linoleic 5,35 μ g/ml (Sigma-Aldrich, L1376)
	Prolină 0,4 mM (Sigma-Aldrich, P0380)
	Ac. ascorbic 2-fosfat 0,17 mM (Sigma-Aldrich, A4403)

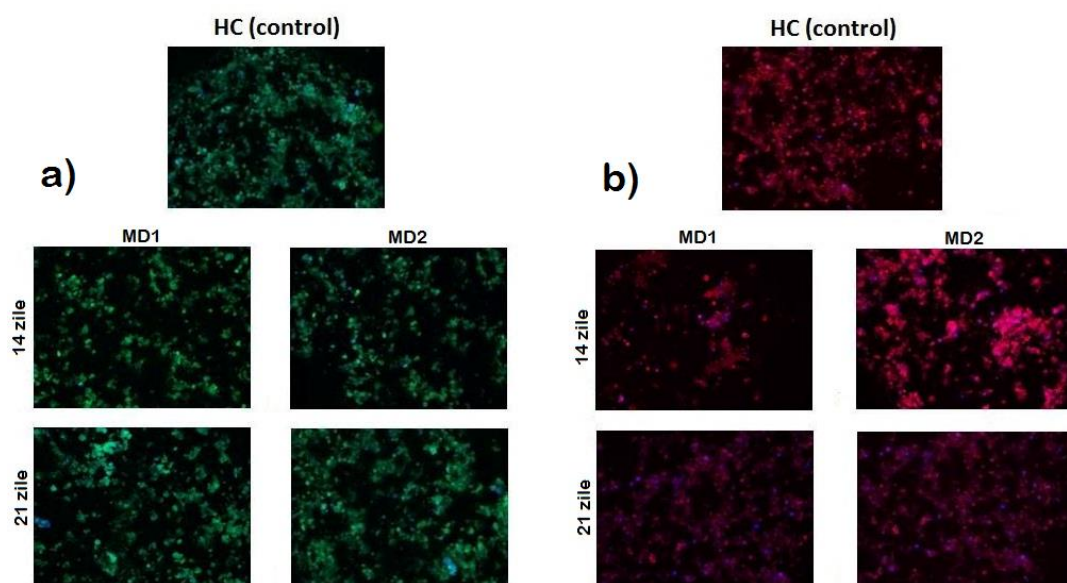


Figura 2- Imagini de microscopie in fluorescenta care evidentiaza (a) prezenta markerului condrogenic Matrilina1 si (b) prezenta markerului condrogenic Sox9 la 14 si 21 de zile post inductie in prezenta MD1 si MD2.

UNIVERSITATEA DIN BUCURESTI FACULTATEA DE BIOLOGIE

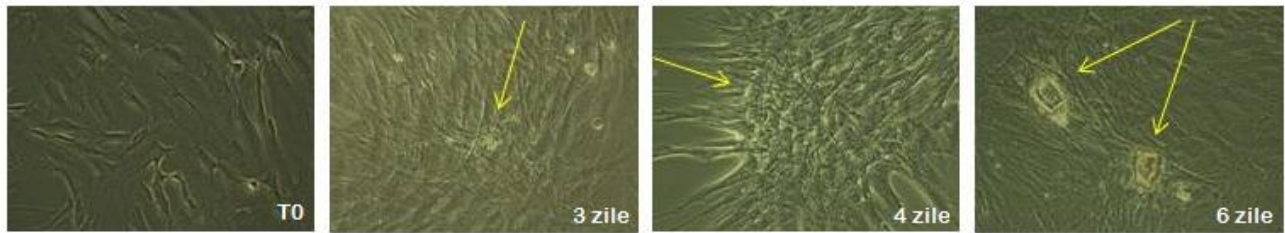


Fig.3- Micrografii reprezentand evolutia celulelor ADAS cultivate in sistem 2D in prezenta MD2 timp de 28 de zile. Sagetile indica centrii de condensare celulara specifici condrogenezei timpurii.

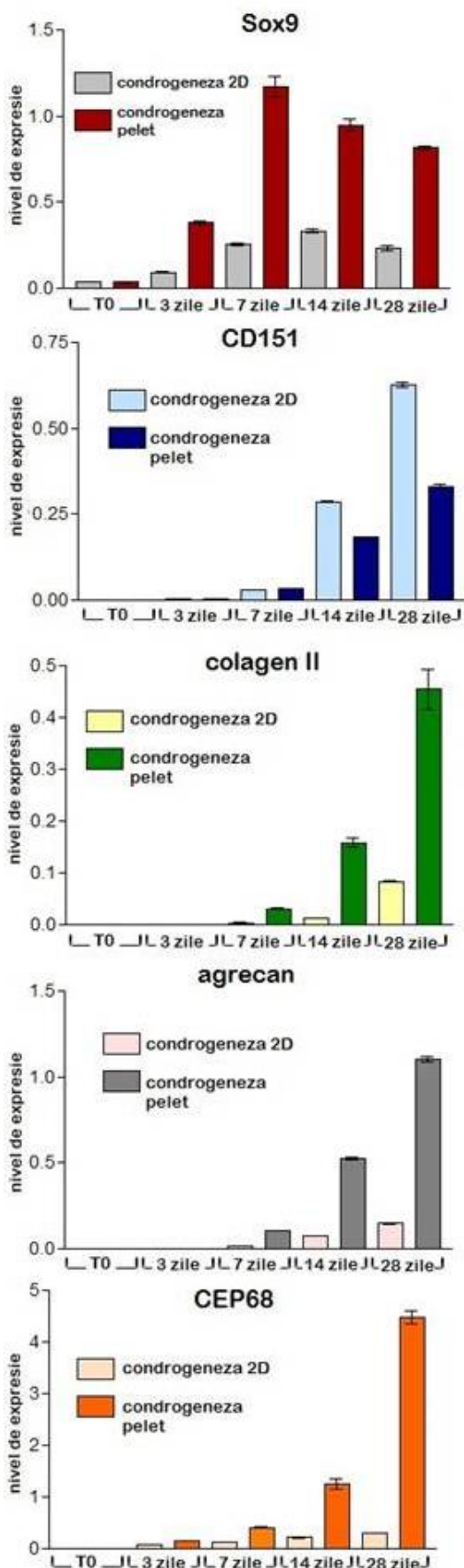
(ii) P1 a testat evolutia procesului de condrogeneza *in vitro* in sistem 2D, comparativ cu cultura in pelet. Pentru obtinerea sistemului de cultura 2D, celulele ADAS aflate in pasajul 4 au fost insamantate la o densitate de 5×10^4 celule/cm² pe suprafete din plastic (flask-uri 25cm²), iar dupa 24 h de cultura in conditii standard, a fost aplicat mediul inductor al condrogenezei MD2. Figura 3 ilustreaza etapele diferentierii condrogenice a celulelor ADAS in sistem 2D timp de 28 de zile post inductie- formarea centrilor de condensare celulara si ulterior formarea peletului specific condrogenezei.

Sistemul de cultura in pelet, care asigura celulelor conditii tridimensionale asemantoare cartilajului, a fost obtinut in placi speciale de tip « cultura in picatura » (Perfecta3D Hanging Drop Plates, 3D Biomatrix) din 2.5×10^5 celule ADAS (in pasajul 4) in mediu MesenPro (Invitrogen) in conditii gravitationale. Dupa 24 h, mediul de cultura specific celulelor ADAS a fost inlocuit cu MD2 (T0), conditionand astfel inducerea condrogenezei in pelet. Mediul de diferentiere a fost schimbat pe parcursul experimentului la fiecare 2 zile. Viabilitatea celulelor ADAS in sistemul de cultura in pelet a fost verificata pe parcursul procesului de diferentiere la 7, 14 si 28 zile post inductie prin microscopie confocala si pe baza kitului de marcare LiveDead (Invitrogen) (Figura 4 din anexa). Principiul marcarii cu kitul LiveDead are la baza 2 componente: *calceinaAM* care este permeabila pentru membrana celulara si poate fi metabolizata in citoplasma celulelor vii, rezultand calceina, un compus fluorescent de culoare verde si *bromura de etidiu*, agent intercalant intre bazele azotate ale acizilor nucleici, capabil sa patrunda in nucleul celulelor care nu mai prezinta integritate membranara si sa emita fluorescanta rosie la legarea de ADN. In figura 4 (anexa) se observa o viabilitate celulara crescuta la 7, 14 si 28 de zile, dar si compactarea celulara in timp.

Procesul de diferentiere condrogenica a fost monitorizat timp de 28 de zile post inductie :

- 1) La nivel genic, prin *RealTime RT-PCR* pentru evidentierea evolutiei procesului de diferentiere in timp la nivelul markerilor condrogenezei. Au fost monitorizati atat markeri timpurii- Sox9 fiind principalul factor transcriptional inductor al condrogenezei- cat si markeri tarzii, specifici matricei extracelulare secretata de condrocitele mature- collagen II, agrecan, Chondrocyte expressed protein 68 (CEP68). In plus, s-a urmarit si nivelul de expresie al CD151, marker de suprafata exprimat numai de condrocitele mature. Profilul expresiei genice pentru Sox9, collagen II, agrecan, CEP68 si CD151 a fost evaluat comparativ la 3, 7, 14 si 28 de zile post inductie in sistem 2D si in pelet, prin raportare la gena de referinta GAPDH si la nivelul expresiei acestor markeri in condrocitele mature (control).

UNIVERSITATEA DIN BUCURESTI FACULTATEA DE BIOLOGIE



Pe scurt, înainte de aplicarea MD2 și la timpii stabiliți pentru evaluarea condrogenezei, a fost extras ARN total din celulele ADAS cultivate atât în sistem 2D cât și în pelet (RNA PureLink Mini Kit (Ambion)). ARN a fost evaluat din punct de vedere al concentrației, purității și integrității (BioAnalyzer, Agilent), apoi reverstranscris la ADN complementar (iScript cDNA Synthesis kit (BioRad)). Secvențele primerilor (Tabelul 3 din anexa) au fost evaluate prin PCR în gradient de temperatură pentru stabilirea temperaturii optime de anelare. Expresia genică a markerilor condrogenici Sox9, CD151, colagen II, agrecan și CEP68 a fost cuantificată prin RealTime RT-PCR în sistemul LightCycler Roche 2.0 (LightCycler Fast Start DNA Master SYBR Green I Kit (Roche)).

Rezultatele obținute indică o **eficiență mai mare a condrogenezei în pelet față de sistemul de cultură 2D**. În Figura 5, se pot observa comparativ profilele de expresie genică pentru markerii condrogenici evaluați. Sox9 prezintă o expresie crescută la 7 zile post inducție și semnificativ mai mare față de expresia înregistrată în celulele ADAS diferențiate în sistem 2D. În schimb, expresia CD151 este semnificativ mai mare în sistem 2D față de celulele diferențiate în pelet, probabil datorită unei mai bune etalări a celulelor și implicit a suprafeței membranare pe plastic (2D) față de aglomerarea celulelor în pelet. Markerii care pun în evidență matricea extracelulară - colagen II, agrecan și CEP68 prezintă profile de expresie crescătoare pe parcursul celor 28 de zile de diferențiere condrogenică, însă cu valori semnificativ mai mari pentru condrogeneza în pelet față de condrogeneza indusă celulelor ADAS în sistem 2D.

2) La nivel proteic, prin *Western Blot*, a fost pusă în evidență expresia markerilor condrogenici Sox9, Colagen II și CEP68 la 7, 14 și 28 de zile post inducție în sistemul de cultură în pelet. Rezultatele obținute confirmă rezultatele RealTime PCR, întrucât expresia proteică a colagen II și CEP68 înregistrează un profil crescător până la 28 de zile, iar Sox9 prezintă cea mai crescută expresie la 7 zile post inducție cu MD2 (Figura 6).

Fig.5- Profilele de expresie genică pentru Sox9, CD151, colagen II, agrecan și CEP68 rezultate în urma reacției RealTime RT-PCR desfășurată comparativ pentru sistemul de cultură 2D și sistemul pelet.

UNIVERSITATEA DIN BUCURESTI FACULTATEA DE BIOLOGIE

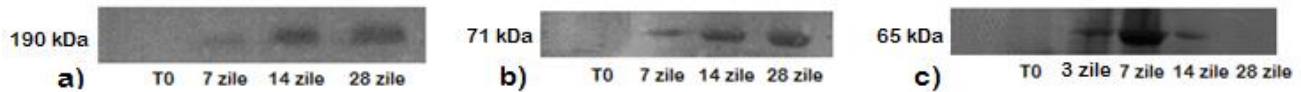


Fig. 6- Profilul expresiei proteice obtinut prin Western Blot pentru (a) colagen II ; (b) CEP68 si (c) Sox9 pe parcursul condrogenzei induse *in vitro* celulelor ADAS cultivate in pelet.

- 3) La nivel proteic, prin *imunofluorescenta* realizata pe sectiuni din pelet la 14 si 28 de zile post inductie s-a urmarit evidentiarea markerilor Sox9, colagen II, agrecan si CEP68. In figura 7 din anexa se pot observa rezultatele obtinute pe criosectiuni, care sunt de asemenea in acord cu datele obtinute prin RealTime PCR. Astfel, expresia Sox9 este crescuta la 14 zile fata de 28 zile post inductie condrogenica, in timp ce imunomarcarea pentru colagen II, agrecan si CEP68 indica o sinteza semnificativ crescuta de matrice extracelulara la 28 de zile fata de 14 zile (Figura 7).

Studiile de imunofluorescenta pe criosectiunile realizate din peletul obtinut in cursul condrogenzei din celule ADAS au fost comparate in permanenta cu studiile realizate pe pelet obtinut din condrocite izolate din cartilaj uman, utilizat in experiment ca si control. In Figura 8 sunt ilustrate aspectul general al peletului si prezenta colagenului de tip II produs de condrocitele mature in cultura de tip pelet.

Concluziile studiilor de condrogenza *in vitro* a celulelor ADAS au relevat :

- (i) Celulele ADAS pot diferentia in celule de tip « chondrocyte-like » in conditii de cultura standard si sub influenta unui mediu inductor al condrogenzei. Celulele diferentiate rezultate in urma procesului sunt capabile sa produca matrice extracelulara specifica cartilajului.
- (ii) Din diferite retete de medii de diferentiere testate pe celule ADAS, P1 a selectat compozitia MD2 ca fiind cea mai eficienta din punct de vedere al inducerii procesului de condrogenza atat in sistem 2D, cat si in sistem pelet.
- (iii) Sistemul de cultivare a celulelor ADAS care permite cea mai eficienta condrogenza *in vitro* este sistemul in pelet, care asigura celulelor conditii tridimensionale similare celor din cartilaj.
- (iv) Factorul transcriptional Sox9 poate fi considerat marker timpuriu al procesului de condrogenza, acesta fiind principalul inductor al procesului ; Colagen II, agrecanul si CEP68 pot fi considerati markeri condrogenici tarzii, caracteristici matricei extracelulare.

Concluziile studiilor de condrogenza vor fi utilizate in etapele urmatoare ale proiectului PCCE248, care vizeaza posibilitatea de diferentiere a celulelor ADAS pe cale condrogenica in **sisteme de cultura tridimensionale** originale, destinate aplicatiilor de reconstructie si regenerare a cartilajului.

In acest sens, in cadrul **activitatii 3.4**, P1 a stabilit, impreuna cu echipele P3 si P7, **numarul de probe si forma de prezentare a sistemelor tridimensionale elaborate de acesti parteneri, in vederea parcurgerii complete in conditii optime a intregului set de teste pentru evaluarea biocompatibilitatii**. Discutiile purtate cu P3 si P7 au avut un caracter deosebit de util, acestea concretizandu-se prin stabilirea unor criterii de calitate in ceea ce priveste sinteza si livrarea sistemelor tridimensionale destinate aplicatiilor de inginerie tisulara a cartilajului. In acest sens, P3 si P7 au efectuat optimizari ale retetelor propuse initial, concretizate prin livrarea unui numar mare de seturi de probe. Discutiile purtate dupa fiecare transa de evaluare a biocompatibilitatii suporturilor

UNIVERSITATEA DIN BUCURESTI FACULTATEA DE BIOLOGIE

furnizate de parteneri au avut un caracter constructiv, asigurand astfel conditiile optime pentru cultivarea celulelor ADAS in sistem tridimensional.

Odata optimizate numarul si forma de prezentare a suporturilor tridimensionale destinate aplicatiilor de condrogeneza, precum si modalitatea de cultivare a celulelor ADAS in aceste sisteme, P1 a inceput **evaluarea biocompatibilitatii in vitro a structurilor scaffold 3D elaborate de P3 si P7 (activitatea 3.3).**

Partenerul P3 a furnizat hidrogeluri pe baza de colagen si sericina (100:40), in 4 compozitii diferite : colagen-sericina-acid hialuronic (HA) 100:40:10, colagen-sericina-HA 100:40:5, colagen-sericina-condroitin sulfat(CS) 100:40:10 si colagen-sericina-CS 100:40:5. Aceste 4 compozitii, destinate reconstructiei cartilajului prin continutul de acid hialuronic sau condroitin sulfat, au fost comparate pe parcursul studiilor de biocompatibilitate cu un control reprezentat de hidrogelul de colagen-sericina 100:40.

Partenerul P7 a furnizat pentru testarea biocompatibilitatii scaffold-uri 3D pe baza de chitosan reticulate cu beta-glicerofosfat, destinate reconstructiei tisulare.

Testele de biocompatibilitate au fost efectuate de P1 utilizand celule ADAS aflate in pasajul 4 si au vizat :

- (i) Evaluarea potentialului citotoxic al suporturilor 3D furnizate prin cuantificarea spectrofotometrica a activitatii enzimei lactat dehidrogenaza (LDH), eliberata in mediul de cultura de catre celulele care nu mai prezinta integritate membranara (*In vitro toxicology assay kit LDH based, Sigma-Aldrich, Co*)
- (ii) Evaluarea viabilitatii si proliferarii celulare in contact cu materialele propuse de parteneri :
 - prin cuantificarea spectrofotometrica a concentratiei de formazan rezultat prin metabolizarea compusului MTT de catre celulele viabile si metabolic active (MTT, *Sigma-Aldrich, Co*).
 - evaluarea calitativa pe baza kitului Live/Dead (Invitrogen) pune in evidenta celulele vii (marcare cu calceină AM) și pe cele moarte (marcare cu bromură de etidiu).

Biocompatibilitatea suporturilor pe baza de chitosan a fost evaluata la 2, 4, 6 si 8 zile de cultura. Insamantarea celulelor ADAS s-a realizat la o densitate de 2.5×10^5 celule/cm² pe suprafata scaffold-urilor, lasand celulele sa patrunda in interiorul structurii tridimensionale prin rețeaua de pori. Sistemele 3D obtinute au fost mentinute in mediu de cultura specific celulelor ADAS pe toata durata experimentului.

Rezultatele testului LDH (Figura 8) indica o citotoxicitate scazuta a materialului la 2, 4 si 6 zile. La 8 zile, inasa, concentratia de LDH eliberata in mediul de cultura este semnificativ crescuta, cu ~32%, indicand o rata crescuta a mortalitatii celulare, comparativ cu situatia de la 6 zile.

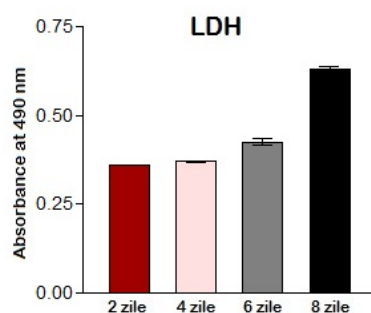


Fig.8- Evidentierea activitatii LDH in mediul de cultura la 2, 4, 6 si 8 zile de la insamantare pentru suporturile pe baza de chitosan.

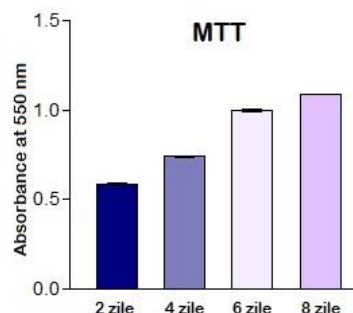


Fig. 9- Evaluarea viabilitatii si proliferarii celulare prin testul MTT la 2, 4, 6 si 8 zile de la insamantarea celulelor ADAS pe suprafata suporturilor pe baza de chitosan

UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI FACULTATEA DE BIOLOGIE

Testul cantitativ MTT efectuat între 2 și 8 zile de cultura a generat un profil crescător al ratei de proliferare celulară (Figura 9). Astfel, celulele au înregistrat o proliferare cu ~25% între 2 și 4 zile, cu ~34% la 6 zile față de 4 zile și cu ~11% la 8 zile față de 6 zile.

Rezultatele testului Live/Dead sunt în perfect acord cu datele obținute la testele cantitative LDH și MTT. În Figura 10 din anexa se pot observa distribuția celulelor ADAS în suport, localizarea celulelor în porii materialului și proliferarea acestora în pori, cu formarea unor grupuri de celule până la 8 zile de cultura.

Pe baza testelor cantitative și calitative efectuate pentru suporturile pe baza de chitosan, furnizate de P7, rezulta că aceste suporturi sunt biocompatibile și pot fi utilizate în continuare pentru studii de diferențiere *in vitro*, după optimizarea dimensiunii porilor și a interconectării acestora astfel încât să permită distribuția celulară uniformă în tot volumul scaffold-ului.

Biocompatibilitatea hidrogelurilor pe baza de collagen și sericina furnizate de P3 a fost evaluată la 2, 4 și 7 zile de la însămânțarea celulelor pe suprafața materialelor. Deși celulele ADAS au fost însămânțate cu o densitate de 2.5×10^5 celule/cm² pe suprafața hidrogelurilor, celulele au reușit să populeze întregul suport, rezultând astfel o cultura 3D. Hidrogelurile pe baza de collagen și sericina în cele 4 compoziții diferite sunt biocompatibile și au generat rezultatele foarte bune, dovedindu-se a fi rețete originale valoroase pentru etapa ulterioară a testării diferențierii condrogenice.

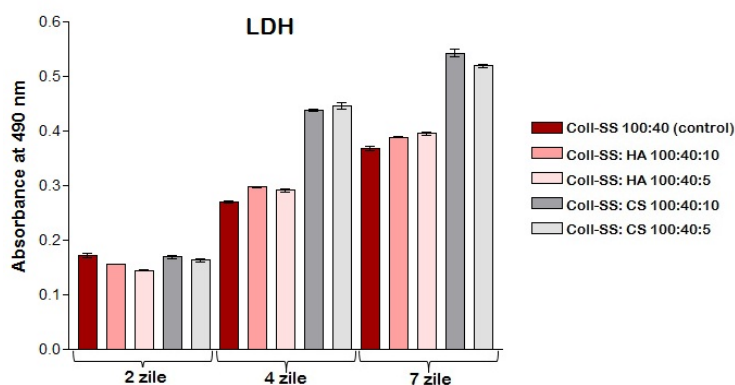


Fig. 10- Evidențierea activității LDH la 2, 4 și 7 zile de cultura în cele 4 compoziții de hidrogeluri pe baza de collagen și sericina

Rezultatele testului LDH au indicat o mortalitate celulară mai scăzută sau egală față de cea înregistrată de control la 2 zile. În schimb, la 4 și 7 zile, compozițiile cu HA au înregistrat valori ale concentrației de LDH în mediu comparabile cu controlul, în timp ce compozițiile cu CS au prezentat concentrații de LDH semnificativ crescute față de control.

Rezultatele testului MTT au indicat o viabilitate celulară bună a celulelor ADAS în contact cu toate compozițiile la 2 zile de la însămânțare. La 4 și 7 zile, rata de proliferare celulară este crescută în prezența HA față de control, raportat la timpul anterior și aproximativ egală cu rata de proliferare a controlului pentru compoziția cu CS 5%. Concluzionând, viabilitatea și proliferarea celulară înregistrează un profil crescător între 2 și 8 zile de cultura.

Testul Live/Dead a confirmat rezultatele obținute prin testele MTT și LDH. În figura 11 din anexa se poate observa etalarea și distribuția celulelor ADAS în hidrogeluri, precum și evoluția ascendentă a ratei de proliferare celulară între 2 și 7 zile de cultura.

De mutat concluzia !!!

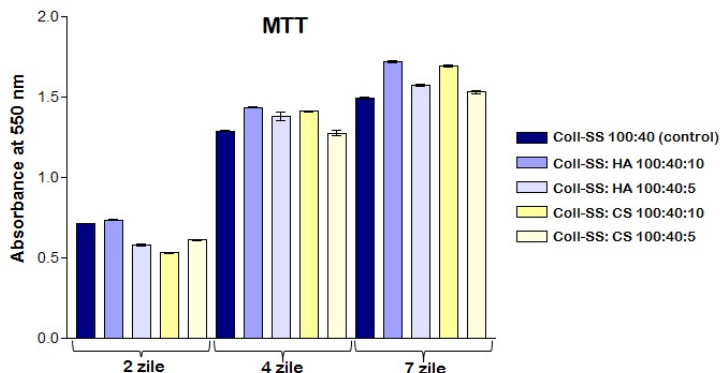


Fig. 11- Evaluarea viabilității și proliferării celulare a celulelor ADAS în contact cu cele 4 compoziții de hidrogeluri pe baza de collagen și sericina la 2, 4 și 7 zile de cultura

UNIVERSITATEA DIN BUCURESTI
FACULTATEA DE BIOLOGIE

-ANEXA-

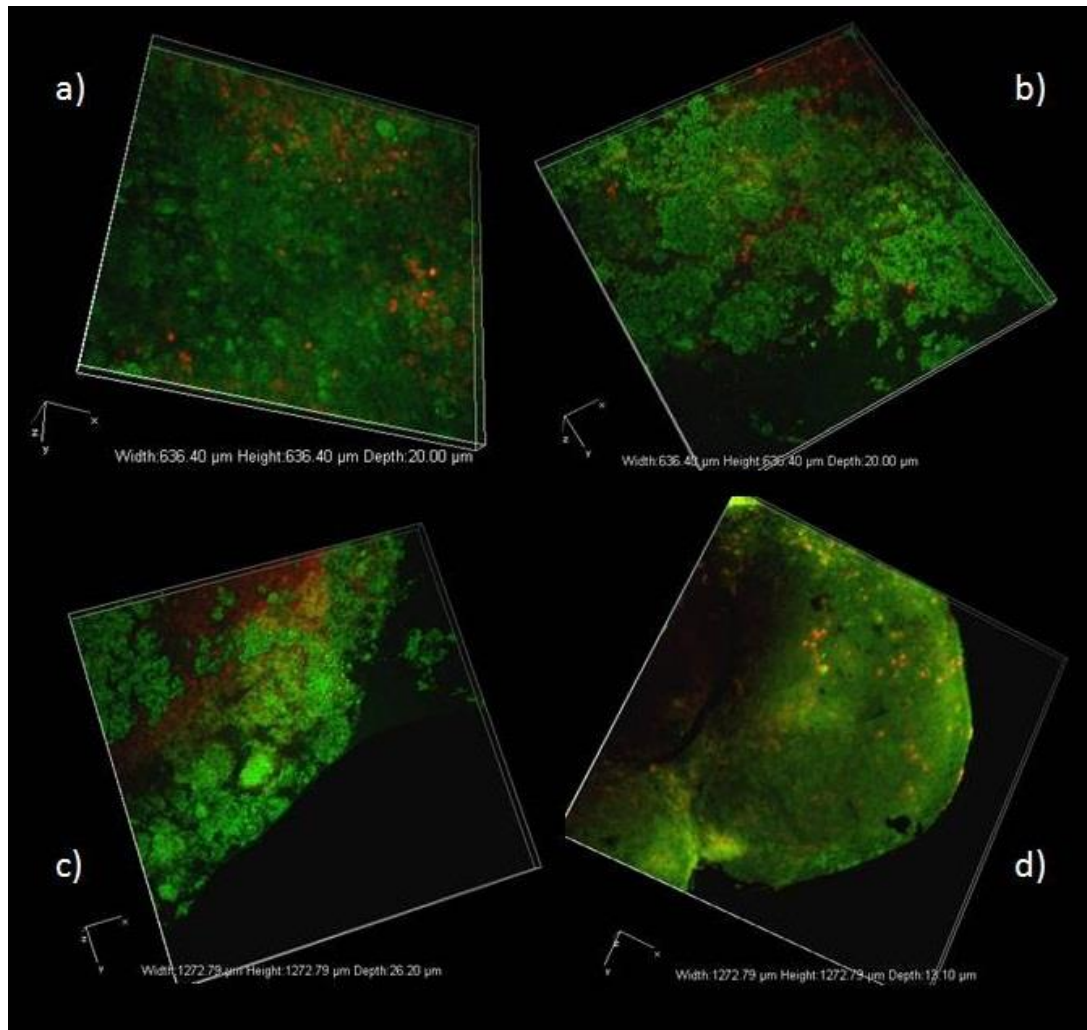


Fig.4- Imagini tridimensionale obtinute la microscopul confocal prin scanarea laser a peletelor obtinute din celule ADAS in cursul condrogenezei la (a) 4 zile ; (b) 7 zile ; (c) 14 zile si (d) 28 zile post inductie cu MD2.

Tabelul 3- Secventa primerilor utilizati pentru cuantificarea markerilor condrogenici prin RealTime RT-PCR

Primer	Secventa in nucleotide	Dimensiune fragment
aggrecan F	5'-ACAGCTGGGGACATTAGTGG-3'	189 bp
aggrecan R	5'-GTGGAATGCAGAGGTGGTTT-3'	
CEP-68 F	5'-TCTTGTCCCATGGAGAGTCC-3'	154 bp
CEP-68 R	5'-GCCCACTCTTCTTGGTGTA-3'	
collagen II F	5'-TCACGTACACTGCCCTGAAG-3'	213 bp
collagen II R	5'-TGCAACGGATTGTGTTGTTT-3'	
Sox9 F	5'-TTGAGCCTTAAAACGGTGCT-3'	244 bp
Sox9 R	5'-CTGGTGTCTGAGAGGCACA-3'	
CD151 F	5'-AACACGGAGCTCAAGGAGAA-3'	160 bp
CD151 R	5'-AGCGGATCCACTCACTGTCT-3'	
GAPDH F	5'-TGGAGAAACCTGCCAAGTATG-3'	223 bp
GAPDH R	5'-GTTGAAGTCGCAGGAGACAAC-3'	

UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI
FACULTATEA DE BIOLOGIE

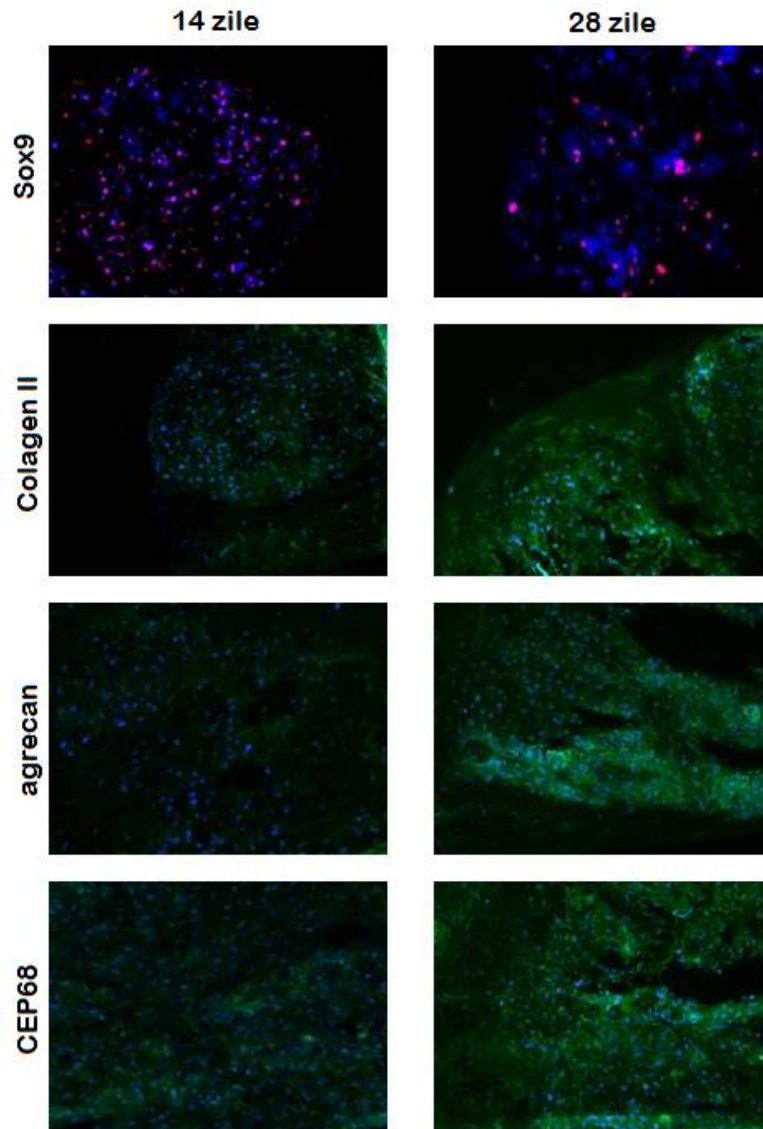


Fig.7- Evidențierea prin microscopie în fluorescență a expresiei markerilor condrogenici Sox9, colagen II, agrecan și CEP68 în celulele ADAS diferențiate în pelet la 14 și 28 de zile post-inducție

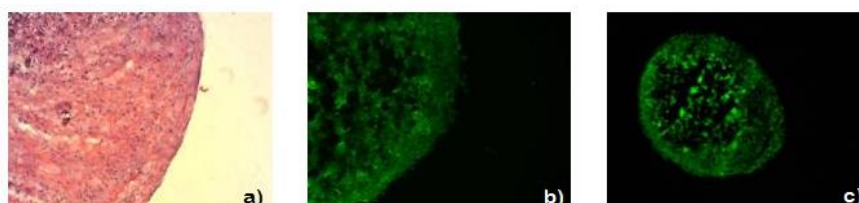


Fig.8- Imagini obținute prin criosecționarea peletului rezultat prin condensarea condrocitelor izolate din cartilaj uman [CONTROL] (a) colorare hematoxilina-eosina; (b) imunomarcarea colagenului II; (c) aspectul general al peletului de condrocite imunomarcate pentru colagen tip II, vizualizat prin microscopie în fluorescență.

UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI
FACULTATEA DE BIOLOGIE

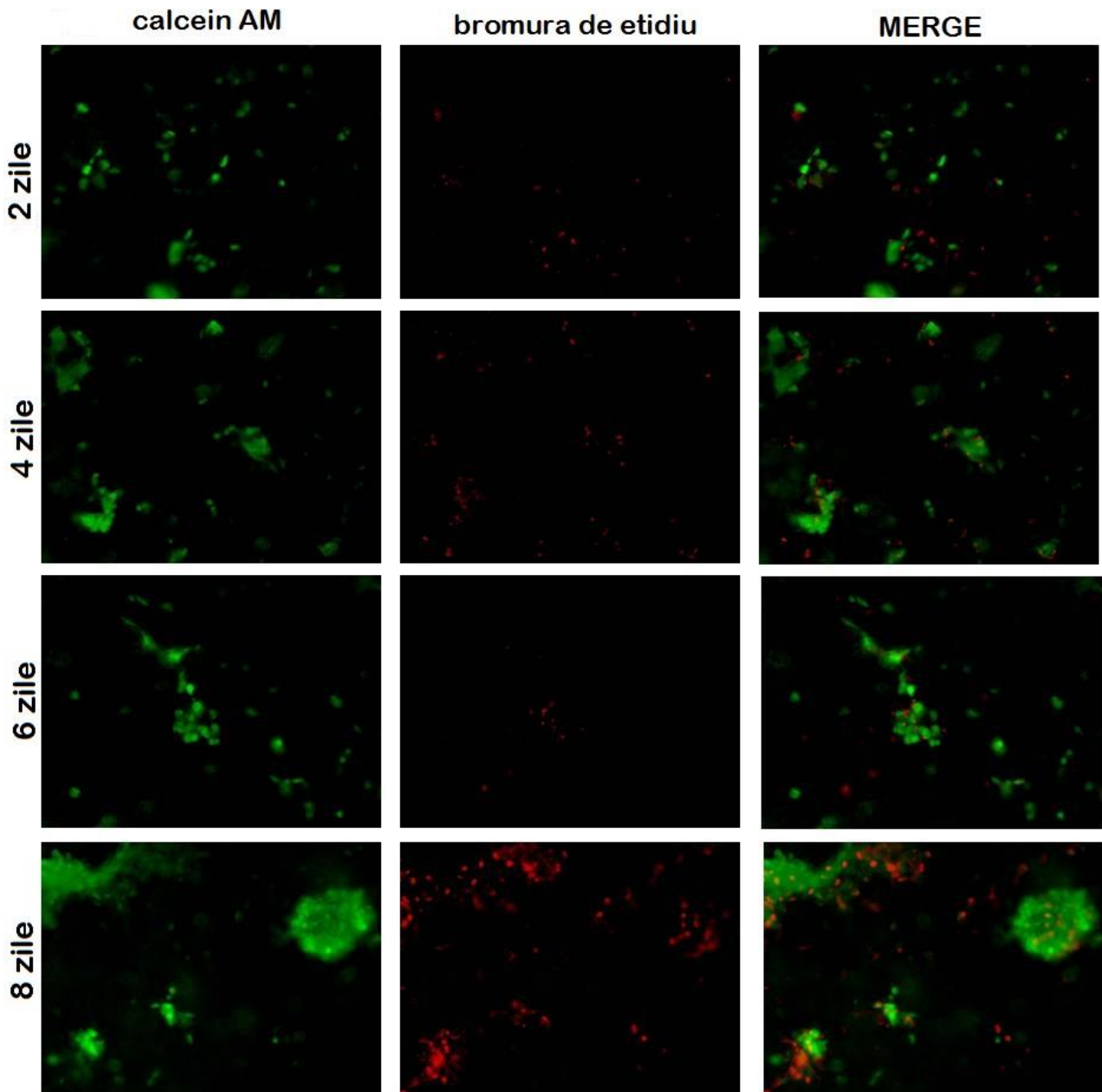


Fig.10- Evidențierea prin microscopie de fluorescență a celulelor vii și a celor moarte în suporturile pe baza de chitosan la 2,4,6 și 8 zile de la însămânțare

UNIVERSITATEA DIN BUCURESTI FACULTATEA DE BIOLOGIE

Tabelul 1- (a) Compozitia mediilor de inducere a adipogenezei testate; (b) distributia in timp a mediilor adipogenice conform protocolalelor elaborate de P1.

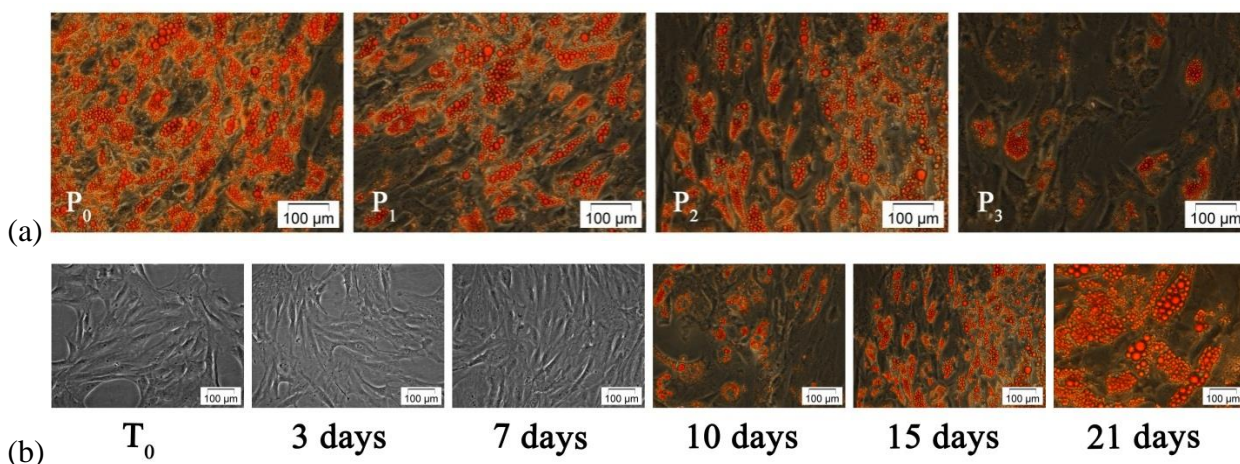
(a)

Mediu	Compozitie	
MD ₀	Mediu adipogenic standard (811D-250), Cell Applications, San Diego, CA, USA	
MD ₁	CM +	0.5 mM IBMX 1 μM DEX 1 μg/ml Troglitazona 1 μM Insulina 10 μg/ml Biotina 200 μM Indometacin 0.1 mM Hidrocortizon 0.2 mM 3,3',5 - Triiodotironina 10 μg/ml Transferina
MD ₂	CM +	10 μg/ml Biotina 200 μM Indometacin 0.1 mM Hidrocortizon 0.2 mM 3,3',5 - Triiodotironina 10 μg/ml Transferina
MD ₃	CM +	0.5 mM IBMX 1 μM DEX 1 μg/ml Troglitazona 1 μM Insulina
MD ₄	CM +	1 μM Insulina 0.2 mM 3,3',5 - Triiodotironina

(b)

21 zile		
Ziua 1-3	Ziua 4-21	
	MD ₀	= P ₀
	MD ₁	= P ₁
MD ₁	MD ₂	= P ₂
MD ₃	MD ₄	= P ₃

Figura 1-



UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI FACULTATEA DE BIOLOGIE

Fig. 11- Evidențierea prin microscopie de fluorescență a celulelor vii și a celor moarte de pe suprafața hidrogelurilor pe baza de colagen și sericina la 2, 4 și 7 zile de la însămânțare

