

Faza 2011
Perioada: 10.12.2010 – 10.12.2011

OBIECTIV: Obținerea de noi structuri suport 3-D destinate cultivării de osteoblaste și celule stem din măduva osoasă umană (*hMSC*), în vederea obținerii de construcții celule-suport caracterizate arhitectural și mecanic, utilizabile în ingineria țesutului osos

Partea experimentală

MATERIALE ȘI METODE

În această etapă s-a realizat testarea biocompatibilității și a capacității osteoinductive a mai multor tipuri de materiale:

1. Materiale cu structură tridimensională realizate din colagen în amestec cu diferite concentrații de sericina și colagen în amestec cu sericina și cu diferite concentrații de hidroxiapatită furnizate de P3:
Coll:Ser = 100:0 Coll:HA 30%
Coll:Ser = 100:20 Coll:Ser:HA = Coll 1.2%;Ser 20%; HA30%
Coll:Ser = 100:40 Coll:Ser:HA = Coll 1.2%;Ser 40%; HA30%
Coll:Ser = 100:60 Coll:Ser:HA = Coll 1.2%;Ser 60%; HA30%
Coll:Ser = 100:80 Coll:Ser:HA = Coll 1.2%;Ser 80%; HA30%
Coll:Ser = 100:100 Coll:Ser:HA = Coll 1.2%;Ser 100%; HA30%
2. Materiale cu structură tridimensională realizate din acid polilactic (PLA) și alcool polivinilic (PVA) și cu diferite concentrații de Ag: PLA, PLA+PVA; PLA+PVA+56SiO₂CaO•4P₂O₅+0%Ag₂O; PLA+PVA+56SiO₂CaO•4P₂O₅+2%Ag₂O; PLA+PVA+56SiO₂CaO•4P₂O₅+4%Ag₂O; PLA+PVA+56SiO₂CaO•4P₂O₅+6%Ag₂O; PLA+PVA+56SiO₂CaO•4P₂O₅+8%Ag₂O; PLA+PVA+56SiO₂CaO•4P₂O₅+10%Ag₂O, furnizate de P6
3. Materiale din biosticle furnizate de P6:
 - alcătuite din: SiCaP și SiCaPNa-300
 - alcătuite din: Zn și Sr: S1Zn/650°C
S2Zn/650°C
S3Zn/650°C
S1Sr/650°C
S2Sr/650°C
S3Sr/650°C
 - alcătuite din 56SiO₂•(40-x)CaO•4P₂O₅•xAg₂O (x = 0, 2, 4, 6, 8): A0; A2; A4; A8; A10
 - 60SiO₂-36CaO-4P₂O₅ (% mol) preparate prin metoda sol-gel în soluții preparate cu apă oxigenată în diferite concentrații, notate cu: B1; B2; B3; B4
4. Materiale metalice pe baza de Ti furnizate de P4:
 - Ti acoperit cu etilenglicol
 - Ti acoperit cu polietilen glicol (PEG): PEG600, PEG1000
 - Ti cu nanotuburi TiO₂ calcinate
 - Ti cu Glicerol:H₂O(60:40 vol. %) + 0.5 wt.% NH₄F depus la 5V, 10V, 15V și 20, notate: as formed, 450°C – 4h, 550°C – 2h, 550°C – 8h
5. Materiale pe baza de aliaje de TiAlNb cu depuneri de nanotuburi de Glicerol:H₂O(60:40 vol. %) + 0.5 wt.% NH₄F la 10 V și 15 V timp de 2 ore - furnizate de P4
6. Aliaj de TiAlNb cu acoperire de Ag și hidroxiapatita- furnizate de P4
7. Ti cu acoperire de hidroxiapatita – furnizate de P5

Testarea biocompatibilitatii si a capacitatii osteoinductive a acestor materiale a fost realizata cu doua linii celulare stabilizate:- o linie stabilizata de celule osteoblast-like provenite din osteosarcom uman (MG63) si

- o linie stabilizata de osteoblaste umane provenita din celule fetale din tesut osos tranfectate cu un vector senzitiv la temperatura; celulele se multiplica la 34°C si diferentiaza la 39°C (hFOB1.19), urmand ca dintre aceste materiale sa fie selectate cele cu biocompatibilitate ridicata, care mai apoi sa fie testate si cu celule stem din măduva osoasă umană (*hMSC*) in faza urmatoare.

Protocolul de testare

Materialele de testat, atat cele cu structura tridimensionala cat si aliajele si materilele de Ti au fost sterilizate in etanol 70 % timp de 24 ore, apoi spalate cu apa sterila si conditionate 24 ore in acelasi mediu in care au fost crescute culturile de celule osteoprogenitoare/osteoblast-like la 37°C. Dupa 24 de ore au fost inoculate cu celule osteoprogenitoare din linia hFOB 1.19 (mediul de cultura folosit: DMEM fara rosu fenol in amestec cu Ham's F12 suplimentat cu 10% ser fetal bovin), 75.000 celule/ml si celule osteoblast-like din linia MG63 (mediul de cultura folosit: DMEM 4,5g/l glucoza uplimentat cu 10% ser fetal bovin inactivat si antibiotice 2% (penicilina, streptomicina si neomicina) fiind apoi plasate la 37°C intr-un incubator cu 10 % CO₂. Mediul de cultura a fost schimbat de 2 ori pe saptamana. In fiecare zi celulele au fost analizate prin vizualizare la microscopul inversat. Dupa 5 zile de cultivare probele au fost analizate din punct de vedere al colonizarii si viabilitatii celulare, iar dupa 1 saptamna, respectiv 2 de cultivare s-a determinat expresia genica pentru markerii osteoblastelor: osteocalcina, sialoglicoproteinele osoase I si II si osteonectina si collagen de tip I.

Colonizarea probelor a fost urmarita prin coloratia cu Hoechst 33251 (nuclei) si faloidina – citoschelet, iar viabilitatea prin testul MTT, iar viabilitatea/citotoxicitatea cu un kit de fluorescanta LIVE/DEATH.

Expresia genica a fost urmarita prin tehnica PCR.

Coloratia cu Hoechst

Celulele crescute timp de 5 zile pe materialele de collagen au fost spalate cu PBS, fixate timp de 24 ore in paraformaldehida 2% si apoi crioprotejate si sectionate cu un criotom Leica CM 1800, obtinandu-se criosectiuni de 6-8 µm. Criosectiunile au fost apoi spalate cu PBS 15 minute, apoi colorate cu Hoechst 33258, spalate cu apa distilata si montate cu glicerol. In cazul celulelor cultivate pe biosticle sau lamele metalice, acestea au fost fixate cu etanol absolut, spalate cu PBS, incubate timp de 20 de minute cu faloidina, spalate din nou cu PBS si colorate apoi cu Hoechst. Examinarea s-a realizat cu un microscop Nikon echipat cu epifluorescenta, iar fotografiile au fost realizate cu o camera digitala Sony DSC-S75. Nucleul celulelor in urma colorarii cu Hoechst va aparea in bleu, iar citoscheletul celular in urma colorarii cu faloidina va aparea colorat in verde.

Viabilitatea celulara – testul MTT

Testul MTT prezinta ca substrat o sare de tetrazoliu (3-[4,5dimetiltiazol-2il] 2,5 difeniltetrazolium. Viabilitatea celulara este redata prin intermediul dehidrogenazelor mitocondriale care reactioneaza cu substratul (albastru) si il transforma intr-un compus formazan colorat in galben, insolubil, solubilizat doar cu izopropanol. Testul se citeste spectrofluorimetric la 570 nm.

Celulele crescute timp de 5 zile pe matricile compozite (in placa de 96 de godeuri) sau pe substratele metalice au fost spalate cu DMEM incolor si apoi incubate timp de 3 ore la 37°C intr-o atmosfera umeda cu 5% CO₂ cu 100 µl MTT 0.5 mg/ml/ godeu (placa 96godeuri sau 200 µl MTT/placa 24 godeuri). Apoi pentru solubilizarea formazanului s-a adaugat cate 100 µl (sau 200 µl) izopropanol cu 0,1N HCl/ godeu. Placa a fost agitata, suporturile de cultivare au fost indepartate si probele au fost citite la 630 nm (blank) si 570 nm.

Viabilitatea/citotoxicitatea celulara

Celulele crescute timp de 5 zile pe matricile 3D sau pe suporturile de biosticla sau metalice cu diferite acoperiri au fost spalate cu PBS, incubate apoi cu o solutie de fluorocromi (SYTO10 – coloreaza in verde acidul nucleic si bromura de etidiu- coloreaza in rosu nucleul celulelor moarte) timp de 15 la intuneric, spalate apoi cu PBS si fixate cu glutaraldehida. Vizualizarea s-a realizat cu un microscop Nikon echipat cu epifluorescenta.

Determinarea prin RT-PCR a expresiei genice

ARN-ul celular total a fost izolat cu un kit Quiagen. Concentratia si puritatea ARN-ului au fost determinate spectrofotometric. RT-PCR-ul a fost realizat intr-un singur pas (utilizandu-se protocolul

kitului Quiagen) folosindu-se 1µg de RNA total/tub de reactie si primerii specifici pentru fiecare gena. Dupa etapa de reverstranscriere (30 minute la 50°C), a urmat etapa de denaturare (30 secunde la 94°C), cea de annealing (30 secunde la 55°C), elongare (1 minut la 68°C) 30 de cicluri, urmata de elongarea prelungita la 68°C, 7 minute. Produsii RT-PCR au fost analizati pe un gel de agaroză 1,5% colorat cu bromura de etidiu, iar cuantificarea s-a realizat cu programul TOTALLAB.

REZULTATE

Colonizarea cu celule osteoblast-like a matricilor cu structura tridimensionala

S-a constatat ca un nivel mai ridicat de colonizare atat cu celule osteoprogenitoare (hFOB la 34 °C) cat si cu celule osteoblaste (hFOB la 39°C) s-a inregistrat pe matricile de colagen cu sericina Coll:Ser = 100:20 si Coll:Ser = 100:40 precum si pe cele cu Coll:Ser:HA = Coll 1.2%;Ser 20%; HA30% si Coll:Ser:HA = Coll 1.2%;Ser 40%; HA30% (Figura 1, 2 si 3).

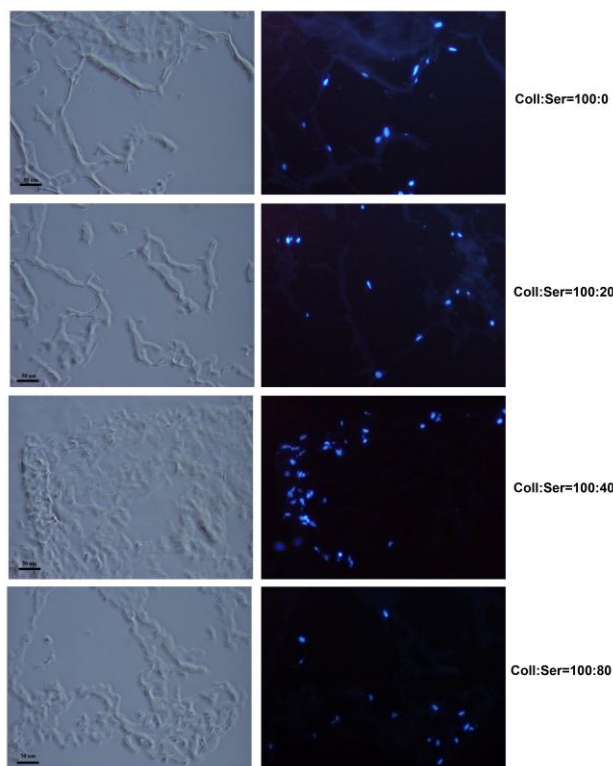


Figura 1. Celule hFOB1.19 - 7de zile de la isamantarea pe matricile colagenice cu sericina (34°C) – Coloratie Hoechst

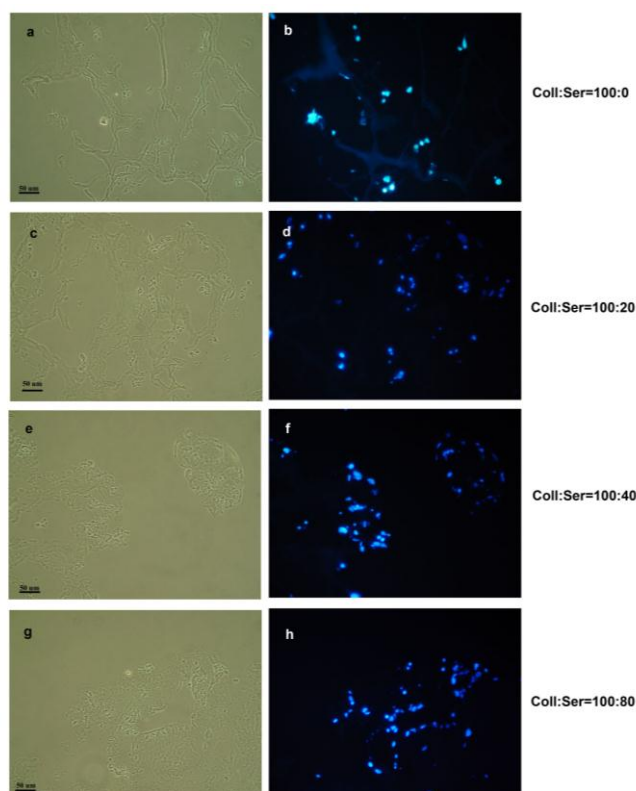


Figura 2. Celule hFOB1.19 - 21de zile de la isamantarea pe matricile colagenice cu sericina (39°C) – Coloratie Hoechst
a, c, e, g – contrast de faza;
b, d, f, h - fluorescenta

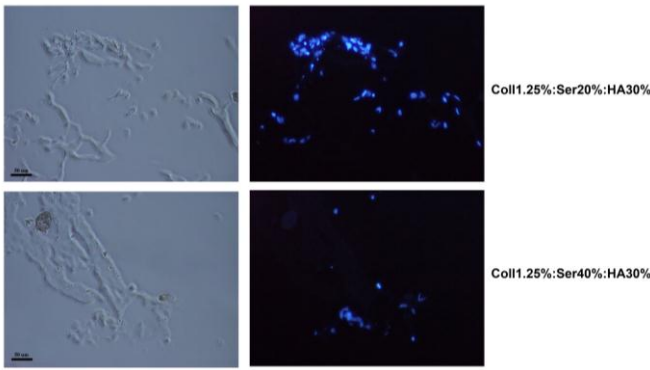


Figura 3. Celule hFOB1.19 - 21de zile de la insamantarea pe matricile collagenice cu sericina (39°C) – Coloratie Hoechst
 panelul din stanga– contrast de faza;
 panelul din dreapta - fluorescanta

In cazul matricilor alcatuite din collagen, sericina si hidroxiapatita s-a observat o densitate celulara mai mare in zonele cu hidroxiapatita.

Viabilitatea celulelor osteoblast-like pe diferite matrici cu structura tridimensionala

Viabilitatea matricilor de collagen:sericina si collagen:sericina:hidroxiapatita afost testata cu linia de celule osteoprogenitoare hFOB1.19. S-a constatat ca atat in cazul probelor de collagen:sericina, cat si in cazul celor de collagen:sericina:hidroxiapatita viabilitatea cea mai ridicata a fost inregistrata pe probele de Coll:Ser = 100:20, Coll:Ser = 100:40 si Coll:Ser:HA = Coll 1.2%;Ser 20%; HA30%, Coll:Ser:HA = Coll 1.2%;Ser 40%; HA30% atat in proliferare (34°C) cat si la diferentiere (39°C) (Figura 4 si 5 Figura 6 si 7).

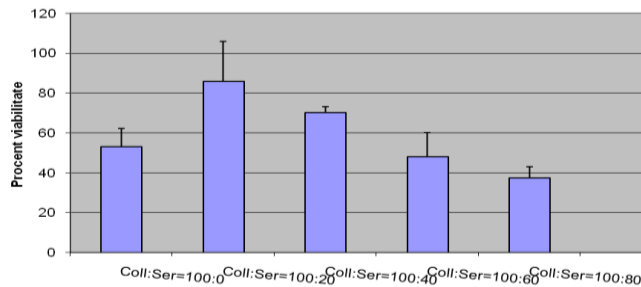


Figura 4. Viabilitatea celulelor osteoprogenitoare hFOB1.19 la 7 zile de la insamantarea pe matricile collagenice cu sericina (34°C)

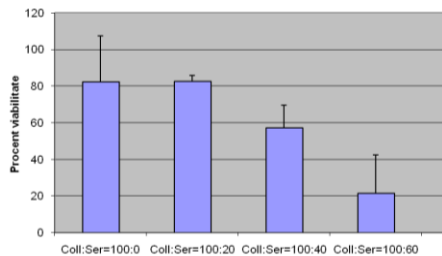


Figura 5. Viabilitatea celulelor osteoblaste hFOB1.19 la 21 zile de la insamantarea pe matricile collagenice cu sericina (39°C); 2 saptamani de la diferentiere.

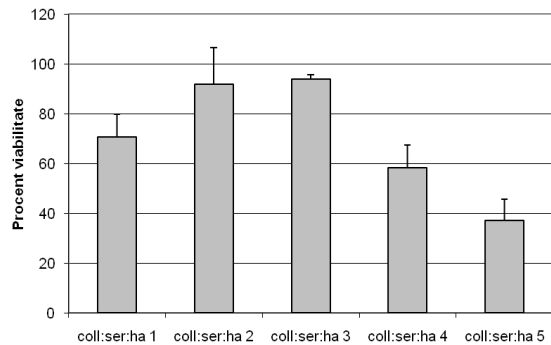


Figura 6. Viabilitatea celulelor osteoprogenitoare hFOB1.19 la 7 zile de la insamantarea pe matricile collagenice cu sericina si hidroxiapatita (34°C)
 coll:ser:ha1= Coll 1.2%;Ser 20%; HA30%; coll:ser:ha2 = Coll 1.2%;Ser 40%; HA30%;
 coll:ser:ha3 = Coll 1.2%;Ser 60%; HA30%;
 coll:ser:ha4 = Coll 1.2%;Ser 80%; HA30%
 coll:ser:ha5 = Coll 1.2%;Ser 100%; HA30%

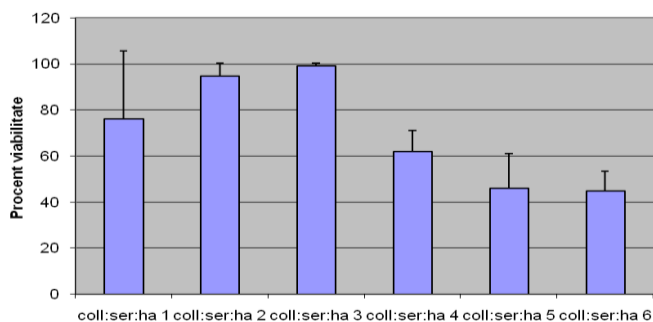


Figura 7. Viabilitatea celulelor osteoblaste hFOB1.19 la 21 zile de la insamantarea pe matricile collagenice cu sericina si hidroxiapatita (39°C)

coll:ser:ha1= Coll 1.2%; HA30%; coll:ser:ha2 = Coll 1.2%;Ser 20%; HA30%;coll:ser:ha3 = Coll 1.2%;Ser40%; HA30%; coll:ser:ha4 = Coll 1.2%;Ser 60%; HA30%;coll:ser:ha5 = Coll 1.2%;Ser 80%; HA30%; coll:ser:ha6 = Coll 1.2%;Ser 100%; HA30%;

In cazul matricilor cu structura tridimensionala alcatuite din PLA+PVA+56SiO₂CaO•4P₂O₅ si diferite concentratii de Ag s-a constatat ca odata cu cresterea concentratiei de Ag viabilitatea celulelor osteoblast-like scade, astfel ca la concentratii de Ag de 10% s-a inregistrat o viabilitate de aproximativ 5% (Figura 8).

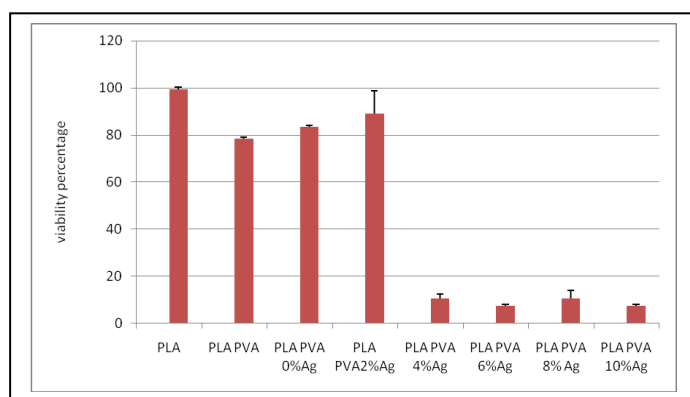


Figura 8. Viabilitatea celulelor osteoblast-like la sapte zile de la insamantarea pe matricile tridimensionale din polimeri sintetici

Aceiasi linie de celule osteoblast-like a fost utilizata pentru testarea biocompatibilitatii probelor de biosticla: SiCaP si SiCaPNa-300; Zn si Sr: S1Zn/650°C, S2Zn/650°C, S3Zn/650°C, S1Sr/650°C, S2Sr/650°C si S3Sr/650°C precum si 56SiO₂•(40-x)CaO•4P₂O₅•xAg₂O (x = 0, 2, 4, 6, 8): A0; A2; A4; A8; A1060SiO₂-36CaO-4P₂O₅ (% mol) preparate prin metoda sol-gel in solutii preparate cu apa oxigenata in diferite concentratii, notate cu: B1; B2; B3; B4.

Celulele MG 63 au colonizat suprafetele de SiCaP si SiCaPNa-300 (Figura 9), inasa toate celelalte probe pe baza de Zn si Sr s-au dovedit a fi citotoxice, B1; B2; B3; B4 au fost partial citotoxice.

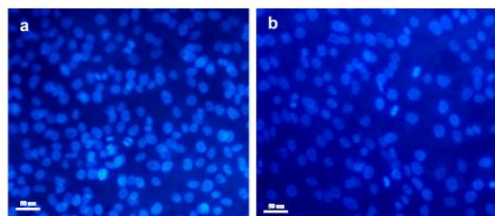


Figura 9. Colonizarea probelor de SiCaP (a) si SiCaPNa-300 (b) cu celule osteoblast-like – 5 zile de la insamantare; Coloratie Hoechst

S-a constatat ca celulele MG63 au prezentat o viabilitate crescuta (aproximativ 90%) pe suportul de SiCaPNa-300 (Figura 10). Insa nu s-a detectat expresie genica decat pentru osteonectina, marker timpuriu al diferentierii in osteoblaste, aceasta expresie fiind usor mai scazuta in cazul celulelor cultivate pe suporturile de SiCaPNa-300 (Figura 11).

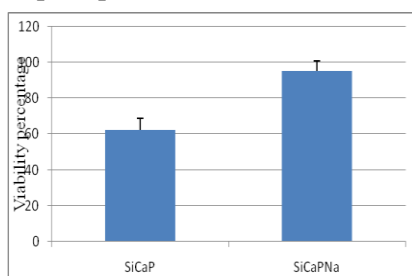


Figura 10. Viabilitatea celulelor osteoblast-like la sapte zile de la insamantarea pe probele de SiCaP si SiCaPNa-300; p=0.000643

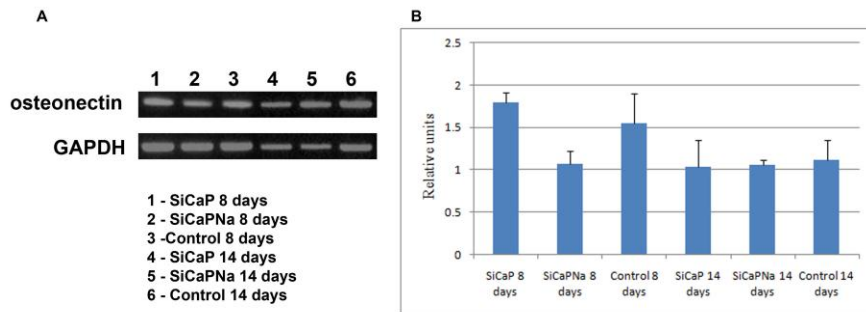


Figura 11. Expresia genica pentru osteonectina in celulele liniei MG63 la 8, respectiv 14 zile de la insamantarea pe probele de SiCaP si SiCaPNa-300; controlul-celule cultivate pe sticla; A - Imaginea unui gel reprezentativ

Testarea biocompatibilitatii si a capacitatii osteoinductive a suporturilor metalice pe baza de Ti si a aliajelor de TiAlNb cu diferite acoperiri a fost realizata prin utilizarea liniei de celule osteoblast-like MG63.

Deoarece probele de Ti cu acoperiri de etilenglicol si polietilen glicol (PEG): PEG600, PEG1000 au fost insuficiente ca numar s-a realizat in acest caz doar testarea citocompatibilitatii acestora cu linia de celule mai sus mentionata. S-a constatat ca cea mai scazuta viabilitate a fost inregistrata pe proba de Ti PEG.

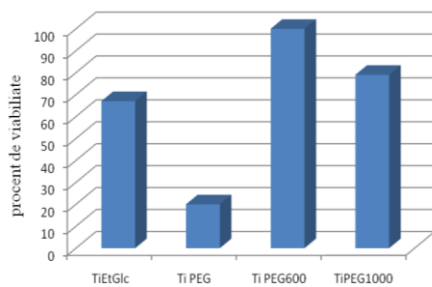
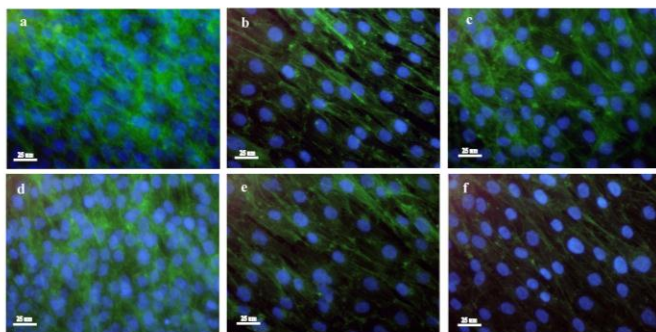


Figura 12. Viabilitatea celulelor osteoblast like la sapte zile de la insamantarea pe probele de Ti acoperite cu diferite tipuri de polietilenglicol.

In cazul probelor de Ti acoperite cu nanotuburi TiO_2 calcinate si necalcinate s-a constatat ca toate aceste probe au permis adararea si multiplicarea celulelor liniei MG63. S-a observat ca pe toate acoperirile testate celulele au avut forma tipica "fibroblast-like" cu filamente de actina prezente in citoplasma si orientate paralel una fata de cealalta si fata de axul celulei (Figura 13).



Celule de osteosarcom uman (MG63) cultivate timp de o saptamana pe Ti si aliaj de TiAlNb
a - proba de Ti, b - proba 4 (nanotuburi TiO_2 calcinate), c - proba 10 (nanotuburi TiO_2 necalcinate)
d - aliaj TiAlNb; e - TiAlNb - TiO_2 calcinate; f - TiAlNb - TiO_2 necalcinate

Figura 13. Celule osteoblast-like cultivate timp de 7 zile pe Ti si aliaje de TiAlNb cu acoperiri de nanotuburi TiO_2 calcinate si necalcinate; Coloratie Hoechst si faloidina

In urma reactiei PCR s-a constatat ca expresia genica pentru osteocalcina a crescut semnificativ pe materialele de Ti si TiAlNb acoperite cu nanotuburi de TiO_2 calcinate comparativ cu nanotuburile necalcinate si cu martorul. In cazul expresiei genice pentru osteonectina nu s-a inregistrat nici o diferenta semnificativa intre probele analizate (Figura 14).

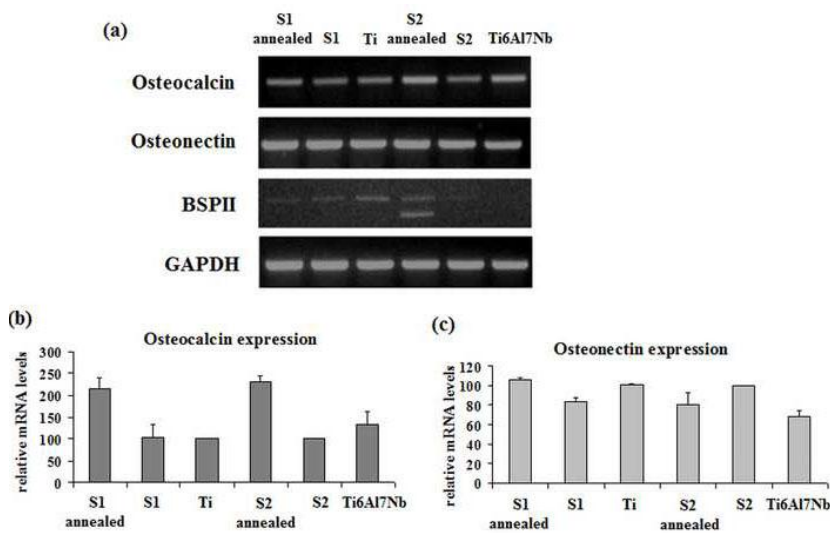


Figura 14. Expresia genica pentru osteocalcina si osteonectina in celulele liniei MG63 la 7 zile de la insamantarea pe probele de Ti si TiAlNb cu acoperiri de TiO₂ calcinate si necaldate

Este cunoscut faptul ca osteonectina si osteocalcina sunt proteine prezente in matricea extracelulara cu rol in procesul de mineralizare. Prezenta expresiei genice crescute pentru acesti markeri in celulele cultivate pe suprafetele acoperite cu nanotuburi de TiO₂ calcinate poate fi explicata prin faptul ca aceste acoperiri de TiO₂ calcinate induc o reactivitate crescuta suprafetelor tratate ceea ce determina diferentierea catre osteoblaste.

Un alt material testat a fost reprezentat de aliajul de TiAlZr cu acoperire de hidroxiapatita si nanoparticule de Ag (nAg) (nAg-HA/TiAlZr) cu structura microporoasa si distributie omogena a acestor nanoparticule pe suprafata aliajului. In acest caz a fost urmarita morfologia si distributia celulelor MG 63 pe suprafetele mai sus amintite, viabilitatea acestora precum si prezenta markerilor specifici osteoblastelor in celulele cultivate pe suprafetele cu hidroxiapatita si nanoparticule de Ag.

S-a observat ca celulele cultivate pe aliajul de TiAlZr cu acoperire de hidroxiapatita si Ag au fost uniform raspandite pe suprafata. Dupa 5 zile de la insamantare s-a constatat ca celulele erau preconfluente si fibrele de actina erau raspandite moderat formand filamente scurte (Figura 15).

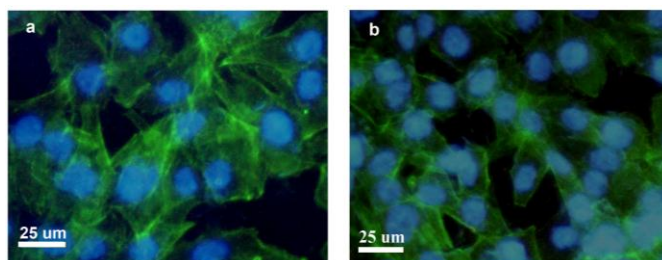


Figura 15. Evidentierea filamentelor de actina (verde) si a nucleilor (bleu) prin microscopie de fluorescanta Celule MG63 cultivate pe (a) TiAlZr si (b) nAg-HA/TiAlZr

Testul MTT efectuat la 5 zile de insamantare a aratat ca activitatea enzimatica a succinil-dehidrogenazelor mitocondriale a fost semnificativ mai redusa in cazul celulelor cultivate pe nAg-HA/TiAlZr comparative cu celulele martor (cultivate pe aliajul de TiAlZr neacoperita (Figura 16).

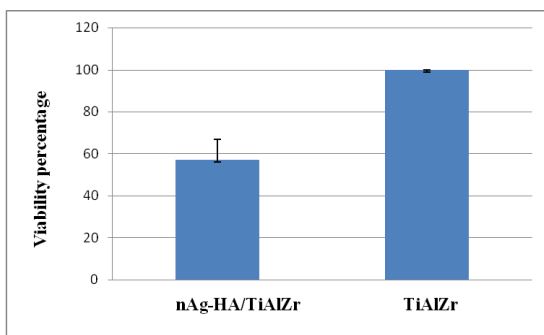


Figura 16. Viabilitatea celulelor osteoblast like la cinci zile de la insamantarea pe probele de TiAlZr si nAg-HA/TiAlZr

Celulele osteoblast-like crescute timp de 7 zile pe probele de TiAlZr si nAg-HA/TiAlZr au fost testate pentru identificarea markerilor specifici osteoblastelor prin PCR. S-a constatat ca expresia genica pentru osteonectina a prezentat nivele similare in celulele cultivate pe TiAlZr si nAg-HA/TiAlZr

comparativ cu celulele martor (cultivate pe palcile de cultura). In contrast inasa, expresia genica pentru osteocalcina si sialoglicoproteina osoasa II (BSP II) ascazut in celulele cultivate pe probele mai sus amintite comparative cu martorul (Figura 17).

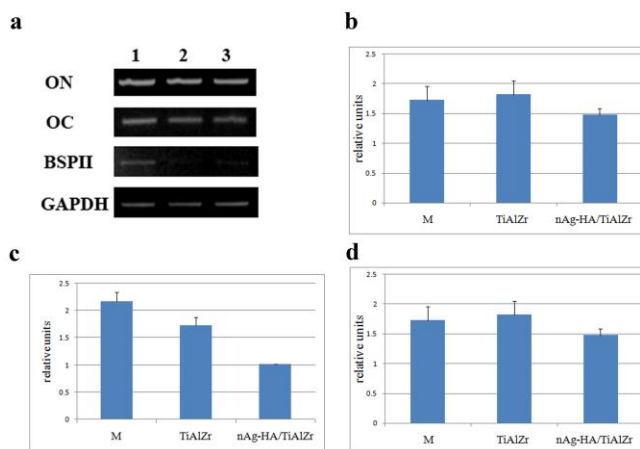


Figura 17. Expresia genica pentru osteocalcina si osteonectina in celulele liniei MG63 la 7 zile de la insamantarea pe probele de Ti si TiAlNb cu acoperiri de TiO₂ calcinate si necalcinate; a – imaginea unui gel reprezentativ, cuantificarea expresiei genice pentru osteonectina (b), osteocalcina (c) si BSP II (d)

In concluzie, aliajul de TiAlZr cu acoperire de hidroxiapatita si nanoarticule de Ag pe langa activitatea antibacteriana pe care o detine inhiba si crestrea celulelor liniei MG63 inducand totodata si scaderea expresiei genice a principalilor markeri specifici osteoblastelor: osteocalcina si BSP II.

O alta serie de materiale metalice testate a fost reprezentata de Ti si aliaje de TiAlNb cu acoperiri de nanotuburi realizate la diferite temperaturi.

In acest caz a fost urmarita colonizarea si viabilitatea acestora cu celulele liniei MG 63 precum si expresia markerilor specifici osteoblastelor in aceste celule cultivate pe suporturile acoperite cu nanotuburi.

In cazul probelor de Ti cu depuneri realizate la 5V, 10V, 15V si 20V s-a constatat ca toate suprafetele testate au fost colonizate cu celule osteoblast-like, celulele pastrandu-si morfologia nemodificata avand forma tipica fibroblast-like (Figura 18, 19, 20, 21).

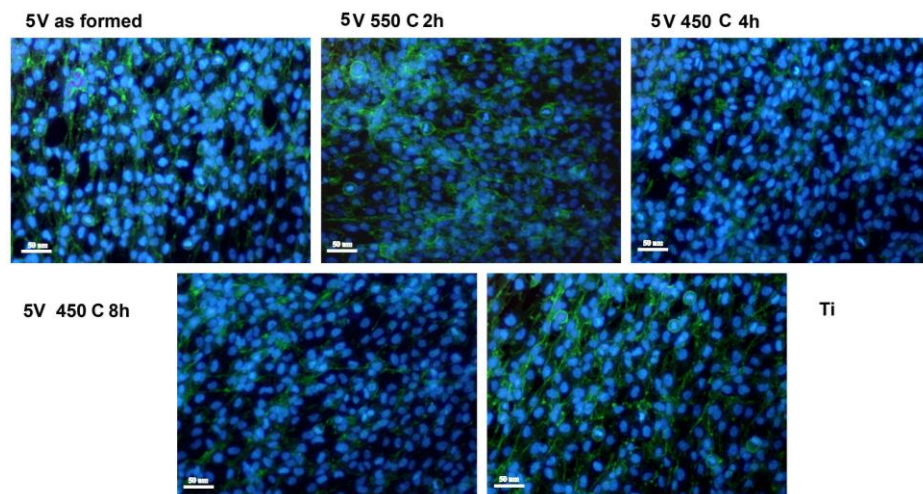


Figura 18. Morfologia celulelor osteoblast-like la 5 zile de la insamantarea pe probele de Ti cu acoperiri depuse la 5V

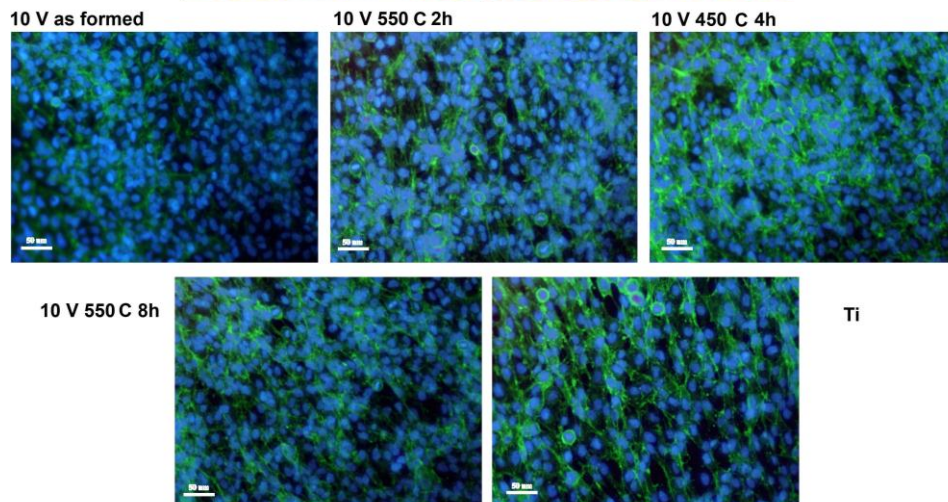


Figura 19. Morfologia celulelor osteoblast-like la 5 zile de la insamantarea pe probele de Ti cu acoperiri depuse la 10V

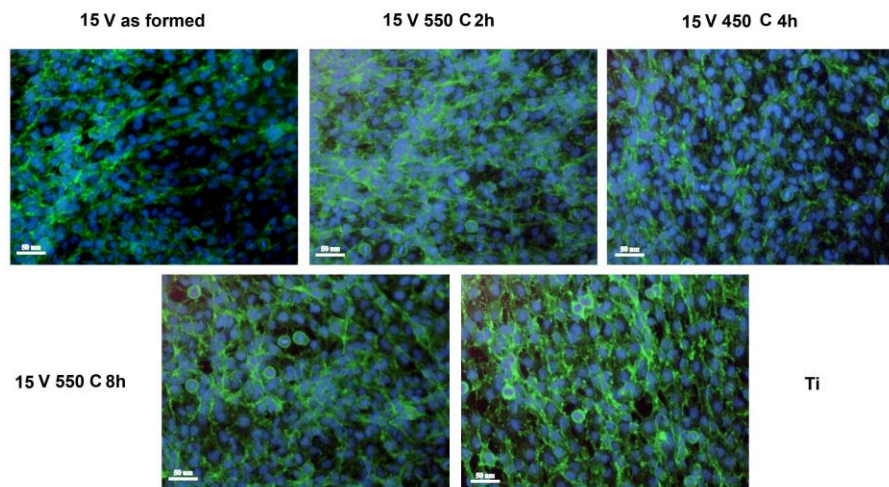


Figura 20. Morfologia celulelor osteoblast-like la 5 zile de la insamantarea pe probele de Ti cu acoperiri depuse la 15 V

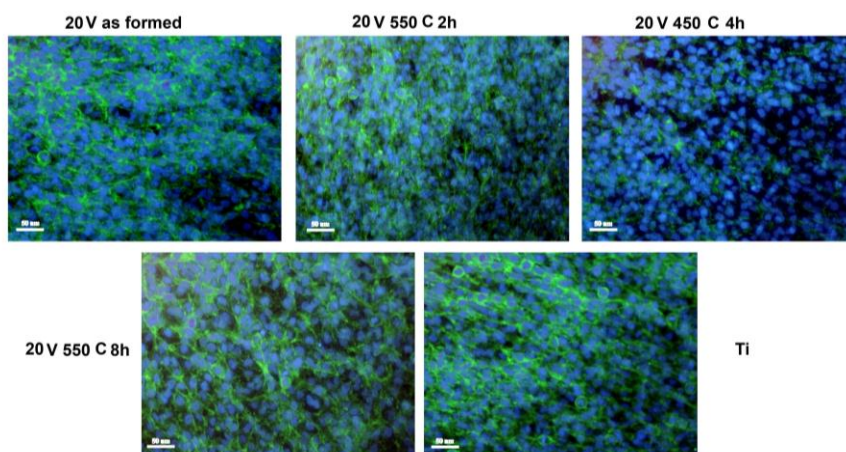


Figura 21. Morfologia celulelor osteoblast-like la 5 zile de la insamantarea pe probele de Ti cu acoperiri depuse la 20 V

S-a observat ca depunerile de Glicerol:H₂O(60:40 vol. %) + 0.5 wt.% NH₄F pe Ti realizate la 5V, 10V, 15V, 20V nu influenteaza expresia genica pentru osteonectina in celulele liniei MG63, neobservandu-se diferente semnificative fata de celulele cultivate pe Ti fara depunere (Fig.22, 23, 24, 25).

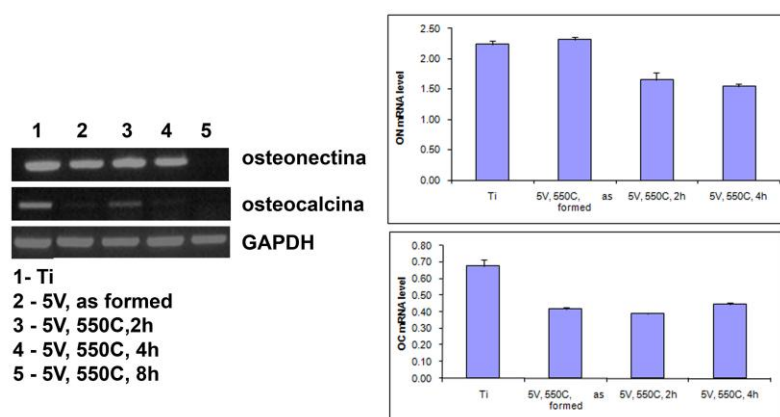


Figura 22. Expresia genica pentru osteocalcina si osteonectina in celulele liniei MG63 la 7 zile de la insamantarea pe probele de Ti cu depuneri de Glicerol:H₂O(60:40 vol. %) + 0.5 wt.% NH₄F depuse la 5V

Expresia genica pentru osteocalcina in celulele cultivate timp de 7 zile pe depunerile realizate la 5V, 10V, 15V si 20V a scazut comparativ cu expresia observata in celulele cultivate pe Ti neacoperit (Figura22, 23, 24, 25)

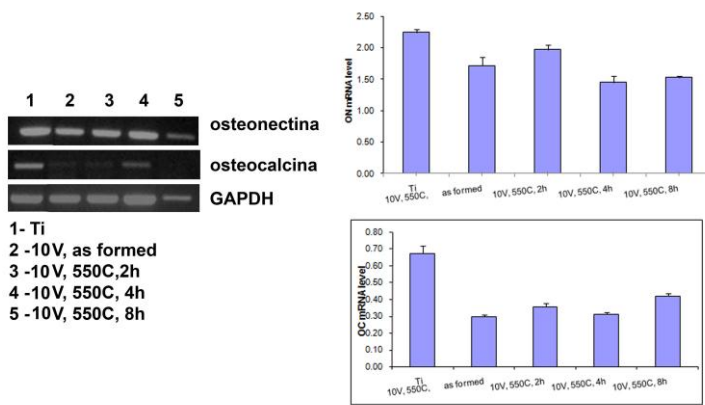


Figura 23. Expresia genica pentru osteocalcina si osteonectina in celulele liniei MG63 la 7 zile de la insamantarea pe probele de Ti cu depuneri de Glicerol:H₂O(60:40 vol. %) + 0.5 wt.% NH₄F depuse la 10V

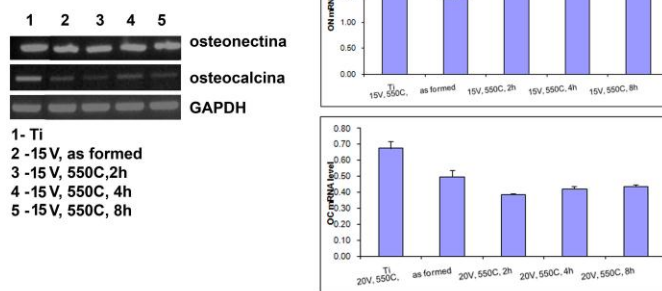


Figura 24. Expresia genica pentru osteocalcina si osteonectina in celulele liniei MG63 la 7 zile de la insamantarea pe probele de Ti cu depuneri de Glicerol:H₂O(60:40 vol. %) + 0.5 wt.% NH₄F depuse la 15V

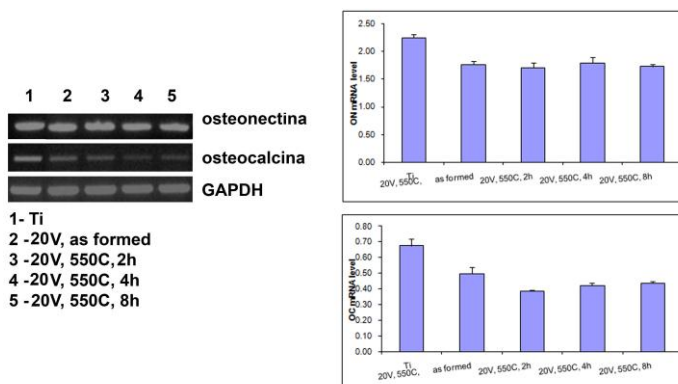


Figura 25. Expresia genica pentru osteocalcina si osteonectina in celulele liniei MG63 la 7 zile de la insamantarea pe probele de Ti cu depuneri de Glicerol:H₂O(60:40 vol. %) + 0.5 wt.% NH₄F depuse la 20 V

Depunerile de Glicerol:H₂O(60:40 vol. %) + 0.5 wt.% NH₄F pe Ti realizate la 5V, 10V, 15V, 20V s-au dovedit a fi citocompatibile cu celulele liniei MG63, permitand dezvoltarea si multiplicarea acestora insa efectul osteoinductor al acestor depuneri nu a fost sesizat in celulele osteoblast-like cultivate timp de 7 zile pe nanotuburile mai sus amintite.

In ceea ce priveste studiul materialelor pe baza de aliaje de TiAlNb cu depuneri de nanotuburi la 10 V si 15 V s-a urmarit colonizarea acestora cu linia de celule MG63, viabilitatea acestor celule precum si inducerea expresiei genice a markerilor specifici osteoblastelor. Astfel s-a constatat ca celulele osteoblast-like au colonizat toate suprafetele testate, inasa cea mai mare densitate celulara a fost inregistrata pe depunerea realizata la 15V (Figura 26), suprafetele fiind citocompatibile cu linia de celule utilizata (Figura 27).

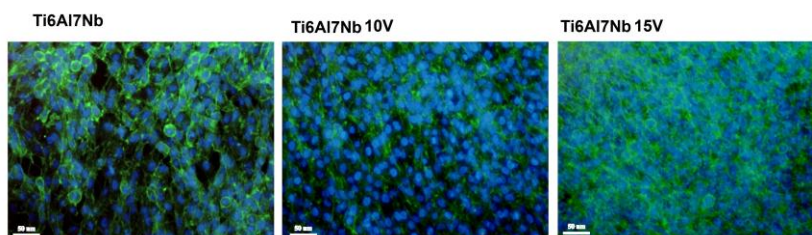


Figura 26. Morfologia celulelor osteoblast-like la 5 zile de la insamantarea pe probele de TiAlNb cu acoperiri depuse la 10 V si 15V

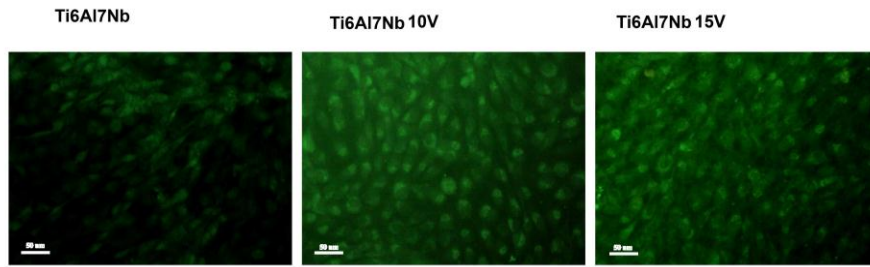


Figura 27. Viabilitatea celulelor osteoblast-like la 5 zile de la insamantarea pe probele de TiAlNb cu acoperiri depuse la 10 V si 15V

Materialele de Ti cu acoperire de hidroxiapatita furnizate de P5 s-au dovedit a fi partial citotoxice pentru celulele osteoprogenitoare din linia hFOB1.19 (Fig.28), neinregistrandu-se diferentierea acestor celule in osteoblaste in interactie cu hidroxiapatita depusa.

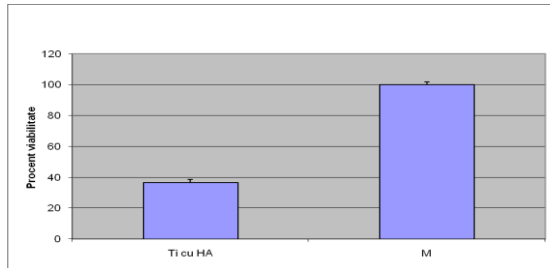


Figura 28. Viabilitatea celulelor hFOB1.19 la cinci zile de la insamantarea pe probele de Ti cu acoperire de hidroxiapatita