

Faza 2012
Perioada: 10.12.2011 – 5.12.2012

OBIECTIV: Obținerea de noi structuri suport 3-D (partenerii P3 și P6) destinate cultivării de osteoblaste și celule stem din măduva osoasă umană (*hMSC*) (partenerul 2- P2), în vederea obținerii de construcții celule-suport caracterizate arhitectural și mecanic, utilizabile în ingineria țesutului osos

INTRODUCERE

Una dintre alternativele actuale posibile de rezolvare a patologiilor țesutului osos vizează utilizarea strategiilor de inginerie tisulară care urmăresc construcția unor biohibridi realizați din celule osteoprogenitoare/osteoblaste și matrici (suporturi tridimensionale) cu proprietăți osteoinductive. Au fost dezvoltate astfel o varietate de biomateriale sub forma de matrici cu structura tridimensională alcătuite fie din polimeri naturali (colagen) [1] precum și combinații ale acestora cu polimeri artificiali [2] sau diferite ceramici bioactive pe baza de fosfat de calciu; de tipul hidroxiapatitei sau fosfatului de calciu bifazic [3] care să substituie țesutul osos afectat. Pentru a putea fi însă utilizate în terapie aceste structuri trebuie să îndeplinească anumite proprietăți: (a) să fie biocompatibile pentru a permite aderența și creșterea celulară, (b) să fie biodegradabile pentru a permite celulelor să-și sintetizeze de-a lungul timpului propria matrice și (c) să prezinte proprietăți osteoinductive (să inducă diferențierea celulelor stem mezenchimale în osteoblaste) promovând în acest fel osteointegrarea; adică stabilirea unui contact strans și stabil între os și materialul implantat. Este cunoscut faptul că o osteointegrare deficitară induce apariția unui țesut conjunctiv fibros în locul noului țesut osos ceea ce determină mobilitatea implantului și în cele din urmă pierderea lui. Sub acest aspect studiile de biocompatibilitate detin un rol major în caracterizarea interacției implant-celule, fiind indispensabile introducerii noilor materiale de implant în clinica umană.

Partea experimentală

MATERIALE ȘI METODE

În această etapă s-a realizat testarea biocompatibilității și a capacității osteoinductive a mai multor tipuri de materiale cu structura 3D precum și biosticle furnizate de partenerii P3 și P6:

1. Materiale cu structura tridimensională realizate din și colagen în amestec cu sericina și cu diferite concentrații de hidroxiapatită (realizate de P3) și colagen în amestec cu sericina și cu diferite concentrații de ceramică bioactivă realizate de P3 în colaborare cu P6:
 - a) 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%
 - b) B:Coll = B30%: Coll
B:Coll:Ser = B30%:Coll 1.2%:Ser 20%
B:Coll:Ser = B30%:Coll 1.2%:Ser 40%
2. Materiale furnizate de P6 realizate din Ca P hidroxiapatită (CaPHA) având compoziția $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ (a) și probe realizate din poliuretân (PU) și polietilen glicol (PEG) cu diferite concentrații de Zn (b) notate:

S1ZnPU – 3% Zn	S1ZnPEGPU -3%Zn
S2ZnPU – 7% Zn	S2ZnPEGPU - 7% Zn
S3ZnPU - 10% Zn	S3ZnPEGPU -10% Zn

Testarea biocompatibilității și a capacității osteoinductive a acestor materiale a fost realizată cu:

- o linie stabilizată de celule osteoblast-like provenite din osteosarcom uman (MG63) care prezintă caracteristici specifice osteoblastelor aflate în stadiile inițiale de diferențiere (activitate enzimatică pentru fosfataza alcalină și expresie pentru osteonectina și BSP1) și
- celule stem din măduva osoasă umană (*hMSC*) recoltate de la pacienți.

Protocolul de testare

Materialele de testat, atât cele cu structura tridimensională cât și probele de ceramică bioactivă au fost sterilizate în etanol 70 % timp de 24 ore, apoi spălate cu apă sterilă și condiționate 24 ore în același mediu în

care au fost crescute culturile de celule osteoprogenitoare/osteoblast-like la 37°C. După 24 de ore au fost inoculate cu celule osteoblast-like din linia MG63 (mediul de cultura folosit: DMEM 4,5g/l glucoza suplimentat cu 10% ser fetal bovin inactivat și antibiotice 2% sau celule hMSC (în acest caz utilizându-se un mediu specific pentru celule stem) fiind apoi plasate la 37°C într-un incubator cu 10 % CO₂. După 5 zile de cultivare probele au fost analizate din punct de vedere al colonizării și viabilității celulare, iar după 1 săptămână, respectiv 2 de cultivare s-a determinat expresia genică pentru markerii osteoblastelor: osteocalcina, sialoglicoproteinele osoase I și II și osteonectina și colagen de tip I.

Colonizarea probelor a fost urmărită prin colorația cu Hoechst 33251 (nuclei) iar viabilitatea prin testul MTT și colorație cu diacetat de fluoresceină și iodura de propidium, proliferarea celulară a fost determinată prin dozarea cantității de ADN iar fosfataza alcalină prin dozarea spectrofotometrică a para-nitrofenolului. Expresia genică a fost urmărită prin tehnica PCR.

Izolarea celulelor stem din maduva osoasă umană

Aspiratul medular recoltat prin puncție la nivelul crestei iliace postero-superioare a fost plasat pe un gradient de Histopaque în acest fel realizându-se separarea celulelor albe de hematii. Apoi celulele mononucleare izolate au fost cultivate într-un mediu specific celulelor stem umane suplimentat cu un ser adecvat, placutele de cultura fiind în prealabil acoperite cu fibronectina. S-a asigurat astfel o multiplicare mult mai bună, în experimente utilizându-se celule aflate la pasajele 2-4.

Inducerea diferențierii în osteoblaste a fost realizată prin suplimentarea mediului de cultivare cu 10⁻⁷M dexametazonă și 10⁻³M beta glicerofosfat de sodiu.

Colorația cu Hoechst

Celulele crescute timp de 7 zile pe materialele de colagen au fost spalate cu PBS, fixate timp de 24 ore în paraformaldehidă 2% și apoi crioprotectate și sectionate cu un criotom Leica CM 1800, obținându-se criosecțiuni de 6-8 μm. Criosecțiunile au fost apoi spalate cu PBS 15 minute, apoi colorate cu Hoechst 33258, spalate cu apă distilată și montate cu glicerol. În 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 faloidină, spalate din nou cu PBS și colorate apoi cu Hoechst. Examinarea s-a realizat cu un microscop Nikon echipat cu epifluorescență, iar fotografiile au fost realizate cu o cameră digitală Sony DSC-S75. Nucleul celulelor în urma colorării cu Hoechst va apărea în bleu, iar citoscheletul celular în urma colorării cu faloidină va apărea colorat în verde.

Viabilitatea celulară – testul MTT

Testul MTT prezintă ca substrat o sare de tetrazoliu (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il] 2,5 difeniltetrazoliu). Viabilitatea celulară este redată prin intermediul dehidrogenazelor mitocondriale care reacționează cu substratul (albastru) și îl transformă într-un compus formazan colorat în galben, insolubil, solubilizat doar cu izopropanol. Testul se citește spectrofluorimetric la 570 nm.

Celulele crescute timp de 7 zile pe matricile compozite (în placa de 96 de godeuri) sau pe substratele ceramice (placa de 24 de godeuri) au fost spalate cu DMEM incolor și apoi incubate timp de 3 ore la 37°C într-o atmosferă umedă 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 adăugat câte 100 μl (sau 200 μl) izopropanol cu 0,1N HCl/godeu. Placa a fost agitată, suporturile de cultivare au fost îndepărtate și probele au fost citite la 630 nm (blank) și 570 nm.

Viabilitatea/citotoxicitatea celulară

Celulele crescute timp de 5 zile pe matricile 3D sau pe suporturile de biosticlă au fost spalate cu PBS, incubate apoi cu o soluție de diacetat de fluoresceină (1 μg/ml) și iodura de propidium (5 μg/ml) timp de 15 la întuneric, spalate apoi cu PBS și fixate cu glutaraldehidă. Vizualizarea s-a realizat cu un microscop Nikon echipat cu epifluorescență. În urma acestei colorații celulele viabile vor fi apărea în verde iar cele necrotice vor prelua iodura de propidium colorându-se în roșu.

Quantificarea ADN-ului

Studiile de proliferare celulară s-au realizat cu ajutorul tehnicii de determinare fluorimetrică a ADN-ului, celulele fiind cultivate în placute de 96 de godeuri. Datorită existenței unui matrix extracelular bine dezvoltat, celulele cultivate pe materialele cu structură 3D și ceramici bioactive au fost sparte prin înghețare în azot lichid și dezghețare rapidă. Apoi pentru colorarea ADN-ului s-a utilizat colorantul Hoechst 33258 (concentrație 10 μg/ml) în 10mM Tris, 1 mM EDTA, 2M NaCl în apă distilată (tampon TNE) pH 7,4, 200 μl/godeu. În paralel s-a realizat o curbă standard de ADN utilizându-se ADN leucocitar uman. Măsurătorile au fost realizate la un cititor de plăci 96 godeuri TECAN, excitație 350 nm; emisie 460 nm.

Detectarea fluorimetrica a fosfatazei alcaline

Celulele crescute pe suporturile 3D si pe ceramicile bioactive fost testate pentru prezenta fosfatazei alcaline dupa o saptamana de cultivare. Tehnica utilizeaza ca substrat para-nitrofenolfosfatul care va fi transformat de fosfataza alcalina in di-nitrofenol. Celulele spalate cu PBS au fost incubate cu paranitrofenol fosfat 9,88 M in tampon TS (Tris baza 0,08 M si MgCl₂ 0,5 M) 30 minute, la 37 °C absorbanta fiind apoi masurata la 405 nm. Paralel a fost construita o curba etalon. Experimentele s-au efectuat pe probe in duplicat.

Determinarea prin RT-PCR a expresiei genice pentru osteonectina, osteocalcina si sialoglicoproteinele osoase (BSP)

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

Din rezultatele fazei anterioare s-a constatat ca un nivel 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 collagen 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%. Astfel in aceasta faza s-a continuat testarea acestor probe precum si a celor pe baza de collagen:sericina:ceramici bioactive cu celule osteoblaste din linia MG63 precum si cu celule stem din maduva osoasa umana (hMSC).

Viabilitatea si proliferarea celulelor osteoblast-like cultivate pe matricile collagenice compozite cu structura tridimensionala

Intr-o prima etapa a fost testata viabilitatea matricilor de collagen:sericina (Coll:Ser), collagen:sericina:ceramici bioactive (B:Coll:Ser) si collagen:sericina:hidroxiapatita (Coll:Ser:HA) cu linia de celule osteoblaste MG63. S-a constatat ca viabilitatea cea mai ridicata a fost inregistrata pe probele de collagen cu ceramica bioactiva precum si pe cea de collagen cu sericina in proportie de 40% si ceramica bioactiva (Fig. 1), restul probelor testate prezentand o viabilitate asemanatoare celulelor martor. Astfel putem concluziona ca toate suporturile au sustinut respiratia celulara, fiind din acest punct de vedere citocompatibile.

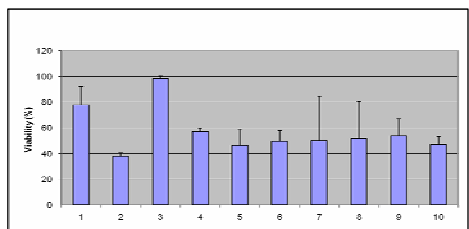


Figura 1. Viabilitatea celulelor osteoblast-like la 7 zile de la insamantarea pe matricile collagenice compozite: 1- B-Coll; 2- B:Coll:Ser20%; 3- B:Coll:Ser40%; 4-Coll; 5- Coll:Ser20%; 6- Coll:Ser40%; 7-Coll:HA; 8-Coll: Ser20%:HA; 9- Coll: Ser40%:HA; 10- celule martor (cultivate pe placuta de polistiren)

In continuare am studiat proliferarea aceleiasi tip celular pe matricile compozite amintite anterior. In acest sens s-au efectuat teste de dozare a cantitatii de AND prin colorare cu Hoechst si citirea fluorimetrica a AND-ului colorat. S-a observat astfel ca cea mai scazuta proliferare dupa o saptamana de cultivare a fost inregistrata pe probele de collagen:sericina:ceramici bioactive (Fig. 2). In cazul probelor de collagen:sericina celulele au proliferat de asemeni mai incet decat in cazul celulelor martor, aditia hidroxiapatitei neinducand in acest caz imbunatatirea proliferarii. Nu au fost inregistrate diferente semnificative din punct de vedere al proliferarii celulelor MG 63 intre proba martor (matrice de collagen simplu) si probele de collagen cu hidroxiapatita si collagen cu sericina (Fig. 2).

In ceea ce priveste probele de collagen:sericina:ceramici bioactive, proliferarea a fost scazuta comparativ cu proba martor (matrice collagen simpla). In cazul acestor probe putem concluziona ca pe aceste suporturi celulele adera si raman viabile, insa nu se multiplica. Din acest motiv testele de biologie moleculara le-am efectuat numai in cazul celulelor cultivate pe matricile collagenice cu sericina si pe cele cu sericina si hidroxiapatita.

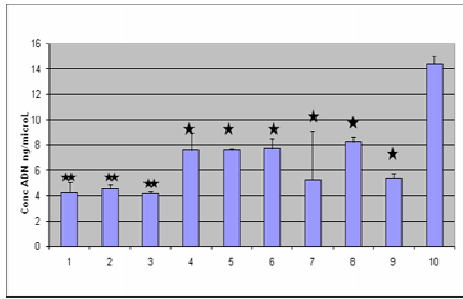


Figura 2. Proliferarea celulelor osteoblast-like la 7 zile de la insamantarea pe matricile colagenice compozite: 1- B-Coll; 2- B:Coll:Ser20%; 3- B:Coll:Ser20%; 4-Coll; 5- Coll:Ser20%; 6- Coll:Ser40%; 7-Coll:HA; 8-Coll:Ser20%:HA; 9- Coll:Ser40%:HA; 10- celule martor (cultivate pe placuta de polistiren)

Determinarea activitatii fosfatazei alcaline in celulele osteoblast-like cultivate pe matricile colagenice compozite cu structura tridimensionala

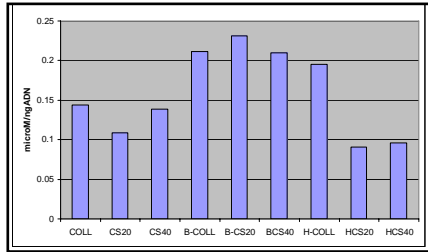


Figura 3. Determinarea activitatii fosfatazei alcaline in celulele osteoblast-like la 7 zile de la insamantarea pe matricile colagenice compozite: Coll- collagen martor; CS20 - Coll:Ser20%; CS40- Coll:Ser40%; B-Coll- collagen:ceramici bioactive; B-SC20- collagen:sericina20%: ceramici bioactive; B-SC40- collagen:sericina40%: ceramici bioactive; HColl- collagen:hidroxiapatita; HSC20- collagen:sericina20%:hidroxiapatita; HSC40- collagen:sericina40%:hidroxiapatita

In urma testelor de determinare a activitatii fosfatazei alcaline s-a constatat ca o activitate enzimatica ridicata s-a inregistrat in cazul celulelor osteoblaste cultivate pe matricile colagenice cu sericina si ceramici bioactive precum si pe cele de collagen:hidroxiapatita (Fig. 3). Desi proliferarea celulara a fost redusa in cazul materialelor 3D de collagen:sericina:ceramici bioactive, celulele au evidentiat activitate ridicata pentru fosfataza alcalina, enzima (marker al osteoblastelor) implicata in procesul de mineralizare, rezultat care poate fi explicat prin faptul ca odata cu inceperea diferentierii proliferarea celulara scade. Bazandu-ne pe datele din literatura putem afirma ca ceramicile bioactive sustin viabilitatea celulara insa probabil induc o diferentiere prea rapida a celulelor, acestea neputand sa se multiplifice suficient inainte de a intra in procesul de diferentiere.

Modularea expresiei genice a BSPII si osteocalcinei in celulele osteoblast-like cultivate pe matricile colagenice compozite cu structura tridimensionala

In urma reactiei PCR s-a constatat ca expresia genica pentru BSPII si osteocalcina a fost asemanatoare cu cea identificata in celulele cultivate timp de 7 zile pe matricile martor reprezentate in acest caz de Coll:Ser si Coll:HA neanregistrandu-se diferente semnificative intre probele testate (Fig. 4). In ceea ce priveste expresia genica pentru osteonectina aceasta nu a fost identificata in nici una dintre probele testate. Este cunoscut faptul ca osteonectina este un marker timpuriu al diferentierii in osteoblaste iar absenta ei poate fi justificata de rezultatele anterioare care au aratat o rapida diferentiere catre fenotipul osteoblastelor mature confirmat de rezultatele de biologie moleculara.

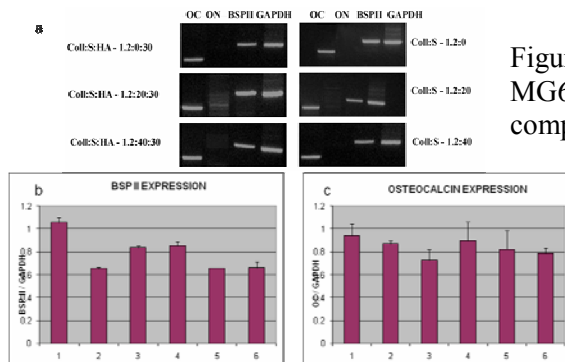


Figura 4. Expresia genica pentru BSP II si osteocalcina in celulele MG63 la 7 zile de la insamantarea pe matricile colagenice compozite: 1 - Coll:Ser; 2 - Coll:Ser20%; 3 - Coll:Ser40%; 4 - Coll:HA; 5 - Coll:Ser20%:HA; 6 - Coll:Ser40%:HA;

- a- Imaginea unui gel reprezentativ rezultat in urma migrarii produsilor PCR;
- b- Cuantificarea expresiei genice pentru BSP II si c - osteocalcina

In urma acestor experimente au fost selectate matricile compozite realizate din collagen:sericina precum si cele din collagen:sericina:hidroxiapatita in vederea evaluarii biocompatibilitatii si a capacitatilor osteoinductive a acestora cu celulele stem provenite din maduva osoasa hematogena (hMSC). Astfel a fost urmarita proliferarea, viabilitatea precum si expresia fosfatazei alcaline evidentiate in celulele stem umane cultivate timp de 7 zile pe suporturile mai sus mentionate precum si

diferentierea acestora in osteoblaste prin suplimentarea mediului de cultivare cu factori osteogenici (dexametazona si β glicerofosfat de sodium).

Viabilitatea si proliferarea celulelor stem umane (hMSC) cultivate pe matricile colagenice compozite cu structura tridimensionala

S-a observat ca spre deosebire de celulele liniei MG63 unde viabilitatea nu a inregistrat diferente in ceea ce priveste probele de Coll:Ser si Coll:Ser:HA (Fig. 1), celulele stem umane prezinta viabilitate crescuta pe matricile de collagen:sericina:hidroxiapatita, aditia hidroxiapatitei inducand cresterea semnificativa a viabilitatii celulare (Fig.5).

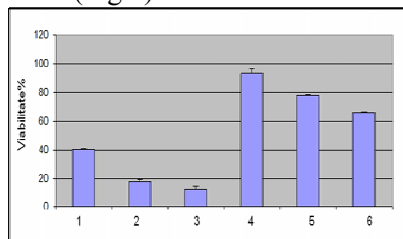


Figura 5. Viabilitatea celulelor stem umane (hMSC) la 7 zile de la insamantarea pe matricile colagenice compozite: 1- Coll; 2- Coll:Ser20%; 3- Coll:Ser40%; 4- Coll:HA; 5-Coll:Ser20%:HA; 6- Coll: Ser40%:HA

In ceea ce priveste proliferarea celulelor stem pe probele colagenice cu sericina precum si pe cele cu sericina si hidroxiapatita s-a observat de asemenea ca sericina inhiba multiplicarea hMSC aditia hidroxiapatitei inducand o usoara crestere a proliferarii (Fig. 6).

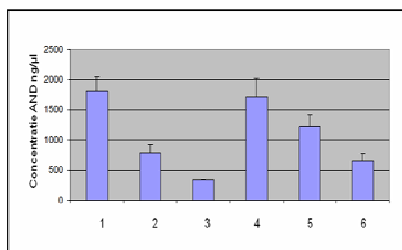


Figura 6. Proliferarea celulelor stem umane (hMSC) la 7 zile de la insamantarea pe matricile colagenice compozite: 1- Coll; 2- Coll:Ser20%; 3- Coll:Ser40%; 4- Coll:HA; 5-Coll:Ser20%:HA; 6- Coll: Ser40%:HA

Determinarea activitatii fosfatazei alcaline in celulele stem umane cultivate pe matricile colagenice compozite cu structura tridimensionala

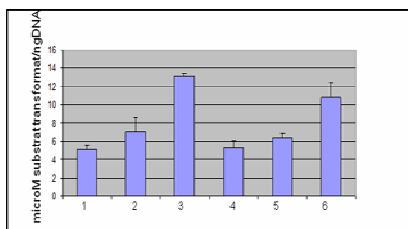


Figura 7. Determinarea activitatii fosfatazei alcaline in celulele stem umane (hMSC) la 7 zile de la insamantarea pe matricile colagenice compozite: 1- Coll; 2- Coll:Ser20%; 3- Coll:Ser40%; 4- Coll:HA; 5- Coll:Ser20%:HA; 6- Coll: Ser40%:HA

Ca si in cazul celulelor osteoblast-like s-a observat ca odata cu scaderea proliferarii apare o crestere a activitatii enzimatice a fosfatazei alcaline, astfel ca cea mai crescuta activitate enzimatice a fost inregistrata in cazul celulelor cultivate timp de 7 zile pe matricile de Coll:Ser40% precum si pe cea de Coll: Ser40%:HA (Fig. 7).

Modularea expresiei genice a osteonectinei, BSPII si osteocalcinei in celulele osteoblast-like cultivate pe matricile colagenice compozite cu structura tridimensionala

Testele de biologie moleculara au fost realizate la 11 zile de la insamantarea pe suporturile compozite precum si dupa 14 zile de la suplimentarea mediului de cultivare cu dexametazona si β glicerofosfat de Na in vederea inducerii diferentierii in osteoblaste. S-a constatat ca dupa 11 zile de cultivare pe matricile compozite au prezentat expresie genica pentru osteocalcina, marker specific osteoblastelor, celulele cultivate pe suporturile de Coll:HA precum si pe cele cu sericina (Fig.8, panel-osteoprogenitor). Comparativ cu celulele martor (cele nediferentiate, cultivate 11 zile in mediul fara agenti de diferentiere) s-a observat o crestere a expresiei genice pentru osteocalcina in cazul celulelor diferentiate pe matricile Coll:HA, Coll:Ser20 precum si aparitia expresiei genice in celulele cultivate pe Coll:Ser20:HA. In cazul matricei de Coll:Ser40:HA nu a fost identificata expresie

genica pentru OC; probabil concentratia crescuta de sericina determinand o diferentiere accentuata a celulelor care totodata induce si moartea acestora (Fig.8 panel –osteoblasts).

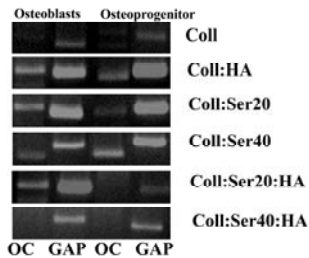


Figura 8. Expresia genica pentru osteocalcina (OC) detectata in celulele stem umane cultivate timp de 11zile pe probele de matrici composite (celule osteoprogenitoare), respectiv 14 zile de la diferentiere pe probele matrici composite (osteoblaste)

Nu a fost identificata expresie genica pentru osteonectina si sialoglicoproteinele osoase nici in celulele nediferentiate si nici in cele diferentiate. Urmeaza ca aceste teste sa fie efectuate si cu alte celule stem umane prelevate de la un alt pacient deoarece nici in celulele martor (celule cultivate pe godeu de polistiren) aceste gene nu s-au exprimat.

O alta serie de probe testate au fost cele furnizate de partenerul P6, acestea fiind biosticle de tipul CaPHA (hidroxiapatita) precum si ceramici bioactive de tipul Zn (in diferite concentratii) in asociere cu poliuretan (PU) precum si Zn in asociere cu polietilen glicol (PEG). In vederea studiilor de citocompatibilitate care vizeaza viabilitatea, proliferarea precum si expresia fosfatazei alcaline s-a utilizat initial linia de celule osteoblast-like MG63 urmand mai apoi in functie de rezultatele obtinute extinderea suidiilor si pe celulele stem prelevate de la pacient. Evidentierea colonizarii acestor structuri s-a realizat prin colorarea celulelor cu Hoechst in cazul probelor de CaPHA si diacetat de fluoresceina si iodura de propidium in cazul probelor pe baza de Zn.

Colonizarea probelor CaPHA cu celule osteoblast-like

In urma coloratiei cu Hoechst s-a observat ca dupa 7 zile de la insamantarea pe structurile de tipul CaPHA celulele au colonizat intreaga suprafata distribuindu-se uniform (Fig. 9).

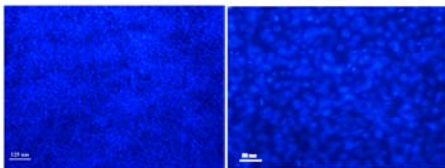


Figura 9. Colonizarea probelor de CaPHA cu celule osteoblast-like – 7 zile de la insamantare; Coloratie Hoechst

Viabilitatea si proliferarea celulelor osteoblast-like cultivate pe biosticlele de tipul CaPHA

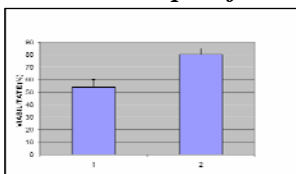


Figura 10. Viabilitatea celulelor osteoblast-like la 7 zile de la insamantarea pe (1) CaPHA si (2) placuta de polistiren –celule martor

Nu s-au inregistrat diferente semnificative privind viabilitatea celulelor MG63 cultivate timp de 7 zile pe probele de CaPHA comparativ cu celulele martor (Fig. 10) spre deosebire de proliferare care a fost semnificativ mai ridicata pe probele de CaPHA (Fig. 11).

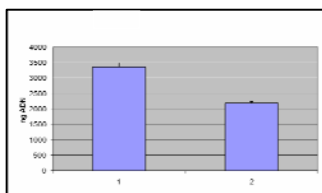


Figura 11. Proliferarea celulelor osteoblast-like la 7 zile de la insamantarea pe (1) CaPHA si (2) placuta de polistiren –celule martor

Cultivate pe substraturile de CaPHA celulele liniei MG63 prezinta o usoara scadere a activitatii enzimatice pentru fosfataza alcalina comparativ cu celulele martor (Fig.12).

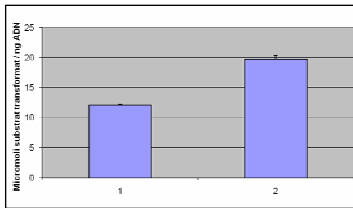
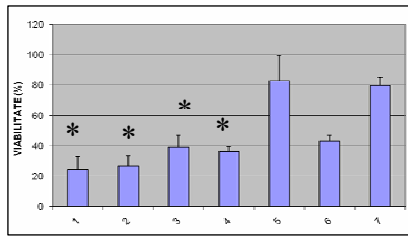


Figura 12. Determinarea activitatii fosfatazei alcaline in celulele osteoblast-like la 7 zile de la insamantarea pe (1) CaPHA si (2) placuta de polistiren – celule martor

In urma acestor teste s-a constatat ca probele de CaPHA au fost citocompatibile cu celulele liniei MG63 inasa nu au indus diferentierea acestor celule catre osteoblaste mature, fapt dovedit de cuantificarea activitatii enzimatice a fosfatazei alcaline. Din acest motiv nu au mai fost efectuate teste de biologie moleculara si de asemeni s-a renuntat la testarea acestora cu celule stem umane.

Viabilitatea si proliferarea celulelor osteoblast-like cultivate pe probele de poliuretan si polietilen glicol cu Zn

Cu exceptia celulelor cultivate pe proba S2ZnPU viabilitatea celulelor osteoblast-like cultivate timp de 7 zile pe probele de PU si PEG cu diferite concentratii de Zn a fost scazuta comparativ cu celulele martor (Fig. 13 si Fig



14). Figura 13. Viabilitatea celulelor osteoblast-like la 7 zile de la insamantarea pe (1) S1ZnPEGPU; (2) S1ZnPEGPU; (3) S3ZnPEGPU; (4) S1ZnPU; (5) S2ZnPU; (6) S3ZnPU; (7) placuta de polistiren –celule martor

In cazul probelor PU a fost remarcat faptul ca aditia Zn in concentratie de 7% induce cresterea viabilitatii (Fig. 13).

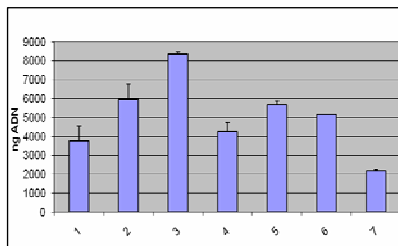


Figura 14. Proliferarea celulelor osteoblast-like la 7 zile de la insamantarea pe (1) S1ZnPEGPU; (2) S1ZnPEGPU; (3) S3ZnPEGPU; (4) S1ZnPU; (5) S2ZnPU; (6) S3ZnPU; (7) placuta de polistiren –celule martor

Dozarea cantitatii de ADN a evidentiat ca cea mai ridicata proliferare a fost inregistrata pe probele de S3ZnPEGPU (Fig. 14). Aceste rezultate vin in contradictie cu cele anterioare inasa pot fi explicate prin faptul ca celulele desi neviabile raman aderente de suporturile de cultivare si astfel cantitatea de ADN este coantificata. O alta explicatie este faptul ca probele nu sunt foarte omogene si ionii de Zn nu sunt uniform distribuiti in probele de PU si PEG, lucru evidentiat de colorarea cu diacetat de fluoresceina si iodura de propidium. Rezultatele urmatoare confirma explicatia anterioara. Astfel s-a constatat ca activitatea enzimatice a fosfatazei alcaline a scazut in celulele cultivate pe materialele cu Zn comparativ cu expresia inregistrata in celulele martor (Fig. 15).

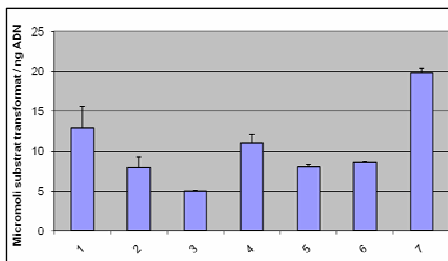


Figura 15. Determinarea activitatii fosfatazei alcaline in celulele osteoblast-like la 7 zile de la insamantarea pe (1) S1ZnPEGPU; (2) S1ZnPEGPU; (3) S3ZnPEGPU; (4) S1ZnPU; (5) S2ZnPU; (6) S3ZnPU; (7) placuta de polistiren –celule martor

Pentru confirmarea testelor de viabilitate s-a efectuat colorarea celulelor MG63 cultivate timp de 7 zile pe probele de PU si PEG cu diferite concentratii de Zn cu diacetat de fluoresceina si iodura de propidium. In una acestor experimente s-a constatat ca in toate cazurile testate celulele au fost neuniform distribuite la nivelul suprafetelor de cultivare fiind concentrate in anumite situsuri care probabil corespund cu prezenta ionilor de Zn (Fig. 16, 17, 18).

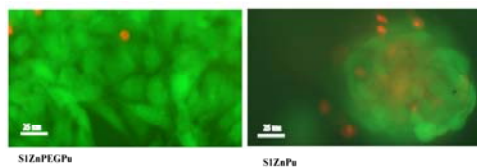


Figura 16. Colonizarea probelor de PU si PEG cu 3% Zn cu celule osteoblast-like – 7 zile de la insamantare; Coloratie diacetat de fluoresceina si iodura de propidium

Testele de microscopie de fluorescena confirma rezultatele dozarilor MTT astfel constatandu-se prezenta atat a celulelor viabile colorate in verde cat si a celulelor necrotice colorate in rosu.

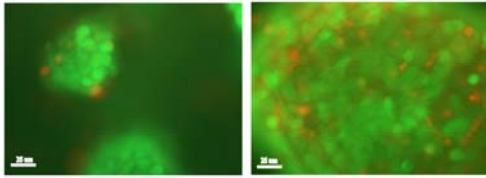


Figura 17. Colonizarea probelor de PU si PEG cu 7% Zn cu celule osteoblast-like – 7 zile de la insamantare; Coloratie diacetat de fluoresceina si iodura de propidium

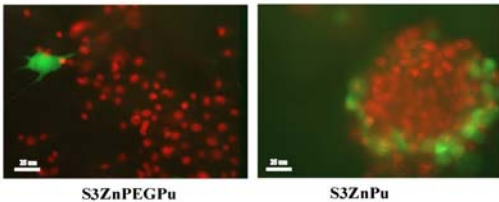


Figura 18. Colonizarea probelor de PU si PEG cu 10% Zn cu celule osteoblast-like – 7 zile de la insamantare; Coloratie diacetat de fluoresceina si iodura de propidium

Prezenta celulelor necrotice a fost semnalata cu precadere la nivelul clusterelor datorita unei oxigenari insuficiente, celulele de la marginea culsterului fiind viabile (Fig.17).

Rezultatele obtinute pana acum pe aceste probe atesta citocompatibilitatea acestora; probele nefiind citotoxice, inasa datorita compozitiei neomogene a probelor de PU si PEG este greu de apreciat viabilitatea, proliferarea si diferentierea celulara. Totusi cea mai ridicata viabilitate a fost inregistrata pe proba PU cu 7% Zn, inasa activitatea fosfatazei alcaline cea mai crescuta a fost inregistrata pe proba PEGPU cu 3% Zn.

Rezultatele obtinute pana acum pe aceste probe atesta citocompatibilitatea acestora; cu toate ca nu sunt citotoxice, datorita compozitiei neomogene a probelor de PU si PEG este greu de apreciat viabilitatea, proliferarea si diferentierea celulara. Totusi cea mai ridicata viabilitate a fost inregistrata pe proba PU cu 7% Zn, inasa activitatea fosfatazei alcaline cea mai crescuta a fost inregistrata pe proba PEGPU cu 3% Zn.

Concluzii generale:

1. Probele 3D pe baza de ceramici bioactive sustin viabilitatea celulara inasa probabil induce o diferentiere prea rapida a celulelor, acestea neputand sa se multiplifice suficient inainte de a intra in procesul de diferentiere.
2. Probele de Coll:Ser si Coll:Ser:HA s-au dovedit a fi biocompatibile cu celulele osteoblast-like, precum si cu celulele stem umane (hMSC).
 - (a) Activitate ridicata pentru FA precum si aparitia expresiei genice pentru osteocalcina si sialoglicoproteinelor osoase (BSPII) a fost inregistrata in cazul celulelor MG 63 cultivate pe suporturile de Coll:Ser:HA.
 - (b) In cazul celulelor stem umane s-a inregistrat viabilitate crescuta pe matricile de Coll:Ser:HA, aditia HA inducand cresterea semnificativa a viabilitatii celulare imbunatatind totodata si proliferarea. Odata cu scaderea proliferarii apare o crestere a activitatii enzimatice a fosfatazei alcaline, astfel ca cea mai crescuta activitate enzimatice a fost inregistrata in cazul celulelor cultivate timp de 7 zile pe matricile de Coll:Ser40% precum si pe cea de Coll:Ser40%:HA. Comparativ cu celulele martor (cele nediferentiate, cultivate 11 zile in mediul fara agenti de diferentiere) s-a observat o crestere a expresiei genice pentru osteocalcina in celulele diferentiate pe matricile Coll:HA, Coll:Ser20% precum si aparitia expresiei genice in celulele cultivate pe Coll:Ser20%:HA.
3. Biosticlele de CaPHA au fost citocompatibile cu celulele liniei MG63 inasa nu au indus diferentierea acestor celule catre osteoblaste mature, fapt dovedit de masurarea activitatii enzimatice a fosfatazei alcaline.
4. Probele 3D de PU si PEG cu diferite concentratii de Zn s-au dovedit a fi citocompatibile cu celulele osteoblast-like, inasa datorita compozitiei neomogene a acestora este greu de apreciat viabilitatea, proliferarea si diferentierea celulara. In urma experimentelor de microscopie de fluorescena s-a constatat ca celulele nu sunt uniform repartizate la nivelul suprafetelor, fiind concentrate in cluster in anumite zone care probabil coincid cu prezenta ionilor de Zn. Distributia celulelor necrotice a fost semnalata cu precadere in interiorul clusterelor datorita unei oxigenari insuficiente, celulele de la marginea culsterului fiind viabile.

BIBLIOGRAFIE

1. Cen L., Liu W., Cui L., Zhang W., Cao Y., *Pediatric Res.*, 63(5), 2008.
2. Lungu A., Albu M.G., Stancu I.C., Florea N.M., Vasile E., Iovu H., *J. Applied Polymer Science*, 127(3), 2013.
3. Daley W. P., Peters S. B., Larsen M. *J Cell Science* 121, 255-264, 2008.