

UNIVERSITATEA DE STIINTE AGRICOLE SI
MEDICINA VETERINARA A BANATULUI TIMISOARA
FACULTATEA DE MEDICINA VETERINARA

RAPORT DE CERCETARE
CONTRACT 1075/2009

GHIDAREA REGENERARII OSOASE PERIOSTALE

ETAPA I: SEPTEMBRIE 2009
STUDII PRELIMINARE CU PRIVIRE LA BIOLOGIA CELULELOR
PERIOSTALE

ACTIVITATEA

- 1.1. Elaborare metoda de izolare a celulelor periostale si subperiostale
- 1.2. Achizitionarea echipamentelor necesare realizarii activitatilor din etapele ulterioare
- 1.3. Elaborare metoda de cultivare a celulelor periostale
- 1.4. Diseminare rezultate obiectiv 1/2009

Director proiect,
Prof. Dr. Igna Cornel

INTRODUCERE

Obiectiv fundamental: in cadrul dezvoltarii unei strategii terapeutice eficiente a repararii defectelor osoase s-a considerat necesara identificarea metodei optime de cultivare – conservare cu elaborarea unei metode optime de diferentiere si izolare a celulelor periostale, vizand deopotriwa componentele straturilor fibros si osteogenic ale acestuia. Segmentele periostale prelevate au fost supuse procesului de separare, elementele celulare obtinute au fost cultivate in medii nutritive clasice si specifice pentru diferentiere pe linie osoasa.

Obiective particulare:

- selectarea metodei optime de izolare si cultivare a celulelor periostale
- elaborarea metodei de diferentiere
- izolarea si identificarea celulelor periostale cu activitate osteogenica

Activitati:

- alcatuirea loturilor de studiu
- recoltarea periostului
- procesarea probelor in vederea cultivarii
- izolarea si cultivarea celulelor obtinute din explant si in urma digestiei periostului
- crioconservarea / decongelarea
- introducerea in incinte de diferentiere
- identificarea prin analize biochimice, histochimice si imunohistochimice a celulelor cu activitate osteogenica

ACTIVITATEA

1.1. Elaborare metoda de izolare a celulelor periostale si subperiostale

Recoltarea probelor de periost in vederea izolarii celulare

Studiul s-a realizat pe 4 câini (tabelul 1), de rasă comună, de ambele sexe, cu vârsta cuprinsă între 3 și 5 ani, cu greutate corporală între 17 și 25 kilograme, de la care sub anestezie generală (acepromazină – ketamină – izofluran) s-a recoltat periost. Explanturile periostale au fost detasate de pe diafiza femurală mijlocie, de la ambele membre, fragmentele avand dimensiunea de aproximativ 10x20mm.

Timpi operatori:

- incizia pielii și a țesutului conjunctiv subcutanat pe partea laterală a membrului,
- acces osos prin dilacerarea boantă a musculaturii,
- periostul a fost detașat de os cu ajutorul decolatorului de periost (fig. 1). Imediat după recoltare fragmentele de periost au fost spălate cu soluție Ringer care a conținut 0,5% penicilină și streptomycină. Fragmentele recultate au fost introduse în plăci cu godeuri, conținând soluție Ringer cu antibiotic și transportate pentru prelucrare (fig. 2).

Probele au fost prelucrate la Centrul de Imunofiziologie și Biotehnologii al Universității de Medicină și Farmacie „Victor Babeș” Timișoara.

Parametrii fizici ai animalelor de la care s-a recoltat periost

Nr. crt	Greutate (kg)	Vârsta (ani)	Sex
1	23,5	3	mascul
2	19	3½	mascul
3	17	3	femele
4	25	4	mascul

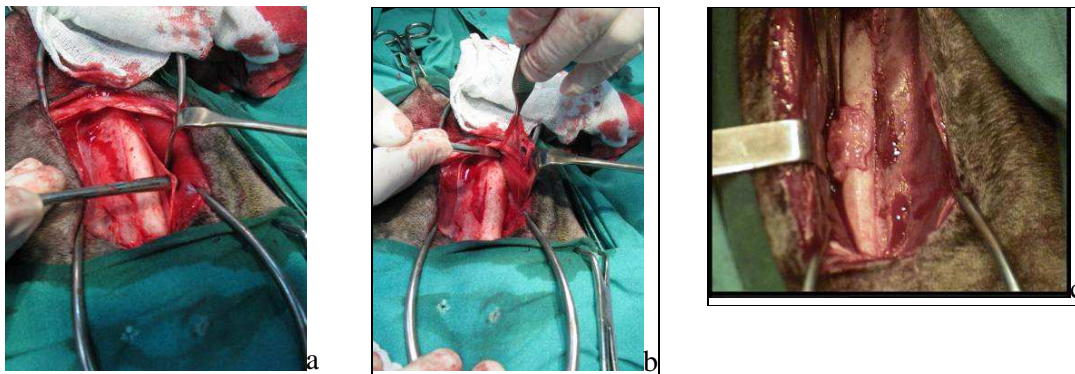


Fig. 1 a, b, c. Aspecte intraoperatorii ale decolării fragmentelor de periost de pe substratul osos



Fig. 2. Aspectul fragmentelor după decolarea de pe suprafața ososă

Jumatate din numarul de lambouri recoltate au fost tăiate în fragmente de 10x5 mm și folosite ulterior ca atare, fiind considerate explanturi, iar celelalte ramase au fost mărunțite și supuse digestiei artificiale.

METODA DE IZOLARE A CELULELOR PERIOSTALE DIN EXPLANT

Lambourile de periost împărțite în fragmente de 10x5 mm, au fost spălate cu PBS. Segmentele rezultate, de aproximativ 0,5 cm², au fost așezate în plăci Petri cu zona osteogenă în contact cu placa și au fost menținute timp de 10 minute în incubator la 37°C pentru a asigura aderența inițială. Lambourile aderente au fost acoperite cu o cantitate suficientă de mediu nutritiv

(DMEM), astfel încât să nu fie posibilă flotarea lor (fig.3). Izolarea celulelor din explant presupune cultivarea timp de patru zile in mediu nutritiv.

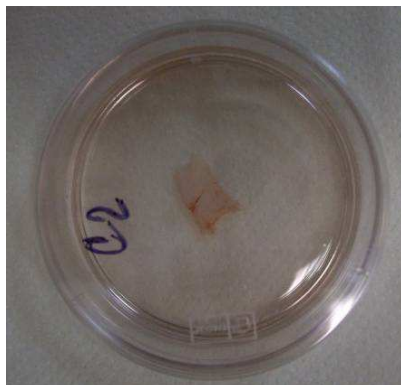


Fig. 3. Aspectul lamboului periostal acoperit cu mediu de cultură

Mediul de cultură folosit DMEM, conține glutamax 1 + 10% ser fetal bovin + 0,5% penicilină streptomycină + 1 % Fungizone + 100μM acid L-ascorbic 2 fosfat.

După ce celulele care au proliferat la marginea fragmentului de periost au ocupat spațiul pus la dispoziție, explantul a fost îndepărtat iar stratul celular a fost tripsinizat și neutralizat cu ser fetal bovin urmând o centrifugare (1000 rpm, 10 min), obtinandu-se astfel izolarea celulelor periostale.

METODA DE IZOLARE A CELULOR PERIOSTALE PRIN DIGESTIE

Fragmentele de periost mărunțite (fig. 4) au fost tratate cu 0,1% EDTA (acid etilen diamino tetraacetic) și 0,2 % tripsină timp de o oră la 37°C. Amestecul a fost spălat de trei ori cu PBS (fosfat bazic salin) și supus digestiei cu 0,2% colagenază (Tipul 1, de origine bacteriană (*Clostridium histolyticum*), SIGMA) (fig. 5), la 37°C timp de trei ore în camere de digestie. Fragmentele rezultate au fost trecute în eprubele sterile de 5 ml și au fost acoperite cu aproximativ 1 ml de colagenază..

Fiecare flacon de colagenază a fost reconstituit cu 5 ml de PBS, iar soluția rezultată a fost filtrată (filtru de 0,22 μ) (fig. 6 si 7). Folosirea acestui tip de filtru a condus la sterilizarea soluției.



Fig. 4. Aspectul fragmentelor de periost mărunțite



Fig. 5. Colagenază tip I



Fig. 6. Filtrarea soluției de colagenază după reconstituire



Fig. 7. Aspectul fragmentelor periostale după adăugarea soluției de colagenază

După finalizarea digestiei, suspensiile celulare rezultate au fost filtrate (fig. 8) (filtru de 70 μ - fig.9), trecute în tuburi și suplimentate până la 20 ml cu PBS (prima spălare) (fig. 9).



Fig. 8. Filtrarea suspensiilor celulare



Fig. 9. Filtrul utilizat pentru purificarea suspensiilor celulare rezultate în urma digestiei

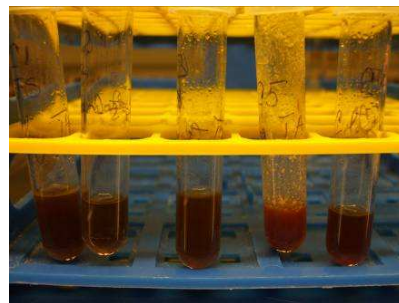


Fig.10. Aspectul la finalizarea procesului de digestie

Suspensiile celulare diluate au fost supuse unei centrifugări la 1 500 rpm timp de 10 minute. După centrifugare s-a înlăturat majoritatea supernatantului (aproximativ 19 ml). Butonul rezultat prin sedimentarea celulelor a fost omogenizat mecanic cu supernatantul reținut, peste aceasta suspensie celulară fiind adăugat PBS până la 20 ml (a doua spălare).

Suspensiile celulare a fost supuse unei noi centrifugări la 1500 rpm timp de 10 minute. După centrifugare s-a înlăturat tot supernatantul iar celulele sedimentate au fost spălate de trei ori cu PBS și fost omogenizate mecanic cu o cantitate redusă de mediu de cultură (DMEM, cca. 1-2 ml).

REZULTATE

În urma prelucurării explantelor la 4 zile, după recoltarea lor, s-a reușit izolarea de celule periostale (fig. 11 a și b) care ulterior după îndepărtarea explantului au rămas în același mediu de cultură în vederea realizării activității următoare (cultivare).

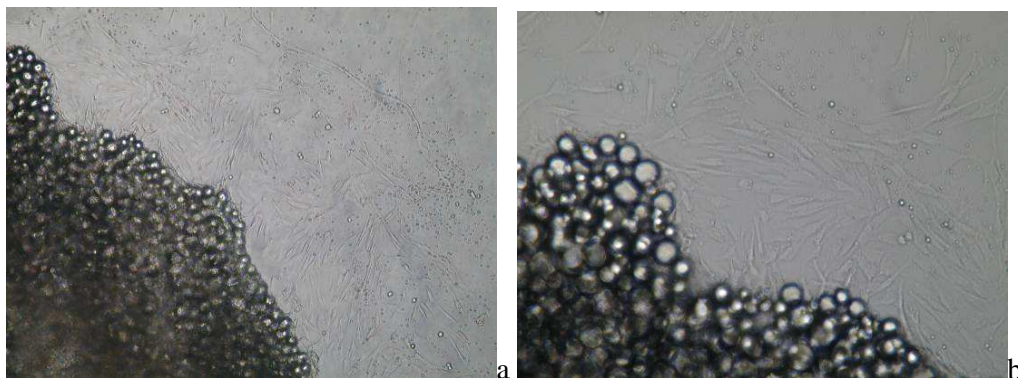


Fig. 11. Aspectul explantului la 4 zile de la introducerea în mediul de cultură
a) imagine cu obiectivul 10X, b) imagine cu obiectivul 20X

Digestia fragmentelor de lambou periostal a permis izolarea de celule periostale (fig. 12) care ulterior au fost trecute în mediu DMEM în vederea cultivării.

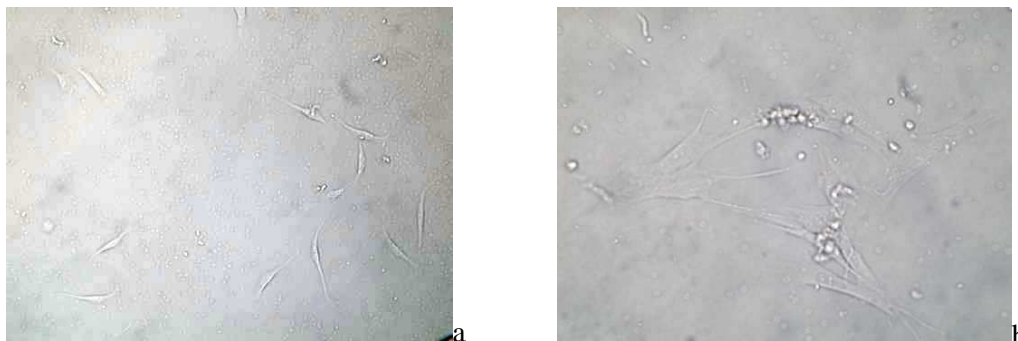


Fig. 12. Celule periostale izolate prin digestie la 4 zile de cultivare
a) imagine cu obiectivul 20X, b) imagine cu obiectivul 40X

CONCLUZIE

Ambele metode de izolare a celulelor periostale s-au dovedit viabile, obținerea celulelor prin tehnica digestiei conferă avantajul realizării într-un timp mai scurt de aproximativ 4-5 ore comparativ cu metoda explantului care presupune cultivarea în vederea izolării timp de 4 zile.

1.2. Achiziționarea echipamentelor necesare realizării activităților din etapele ulterioare

Conform planului de realizare a proiectului s-a făcut achiziția incintelor pentru cultivarea celulelor periostale, medii de cultură și reactivi (Collagen Type I (D-13) goat policlonal Ig, 200 ug/ml, BCPI/NBT liquid substrate system, Sigma fast p-nitrophenyl phosphate, 4-nitrophenol

pestanal, gentamicin solution cell culture tested) și a incintelor de diferențiere (Lab-Tek(R) Chamber Slide 4 Well on Glass (16 EA)).

1.3. Elaborare metoda de cultivare a celulelor periostale

Celulele obținute în urma izolării din explanturile periostale au fost cultivate timp de încă șase săptămâni, mediul nutritiv (DMEM) fiind schimbat la fiecare 48 de ore, în această perioadă s-au realizat trei pasaje. Morfologia celulară a fost evaluată cu microscopul cu contrast de fază la 4, 5, 8 și 14 zile de la introducerea explanturilor în mediul de cultura, interval de timp care include și etapa de izolare deoarece aceasta a necesitat menținerea pe mediu de cultura și implicit cultivarea celulelor.

Celulele obținute în urma digestiei au fost cultivate timp de șase săptămâni perioadă în care mediul a fost schimbat din două în două zile, realizându-se trei pasaje celulare.

Din aceste suspensii s-au prelevat probe care au fost transferate într-o placă cu godeuri și au fost colorate cu tripan blue (10 μ l suspensie celulară și 50 μ l tripan blue). Amestecul colorant – tripan blue a fost transferat în hemocitometru pentru numărarea celulelor și determinarea viabilității lor (prin microscopie).

Celulele cultivate au fost crioconservate timp de patru luni. Amestecul criogenic a fost preparat dintr-o parte DMSO și patru părți FCS, la care s-a adăugat 1% penicilină. Într-un criotub de 1,8 ml se introduc $\frac{1}{2}$ amestec criogenic și $\frac{1}{2}$ suspensie celulară în mediul de cultură DMEM. Criotuburile se introduc într-un criobox care conține alcool izopropilic, acesta se introduce în camera de congelare la -80°C pentru 24 de ore, apoi criobox-ul a fost introdus în N lichid la -180°C .

Decongelarea s-a realizat prin imersarea criotuburilor în apă la 37°C . După decongelare amestecul criogenic a fost spălat cu PBS, iar celulele au fost introduse în incintele de diferențiere, pe fiecare lamă de sticlă sunt lipite cu silicon câte patru incinte de diferențiere (fig. 13), în primele două incinte s-au introdus suspensie celulară cu mediu de cultură osteogenic (experimental) iar în celelalte două incinte au fost introdusă suspensie celulară cu mediul nutritiv DMEM considerate martor, pentru 10 zile perioadă în care mediul a fost înprospătat de trei ori. În fiecare incintă de diferențiere au fost introduse aproximativ câte 30 000 de celule în suspensie.

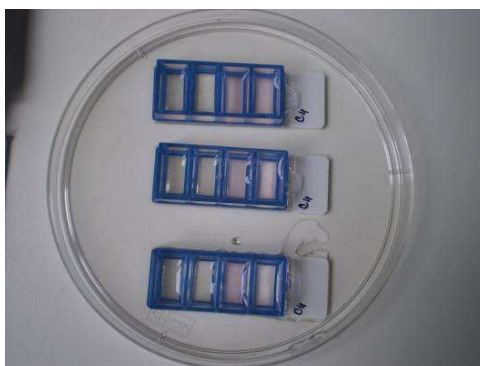


Fig. 13. Lame de sticlă cu incinte de diferențiere continand culturi celulare in suspensie cu mediu osteogenic (experimental) și cu mediu DMEM (martor)

Pentru analizarea diferențierii osteogenice a culturilor celulare s-a determinat activitatea fosfatazei alcaline, determinarea colagenului de tip I precum și mineralizarea matricei extracelulare după următorul protocol:

1. Determinarea activității fosfatazei alcaline

Activitatea fosfatazei alcaline în culturile celulare a fost determinată histochimic. După îndepărtarea mediului de cultură cu ser Ringer la 4⁰C, celulele au fost fixate cu acetona la -20⁰C timp de 5 minute, după varsarea acetonei din camera de diferențiere, culturile au fost spălate cu apă distilată rece și lăsate să se usuce timp de 30 de minute.

Culturile au fost incubate timp de 10 de minute cu BCIP/NBT (5 bromo - 4 cloro - 3 indol fosfat / tetrazolium nitrat albastru), lichid substrat la temperatura camerei prin agitare continuă (fig. 14 și 15).



Fig. 14. Substratul BCIP/NBT



Fig. 15. Incubare la temperatura camerei cu agitare continuă

Reacția a fost oprită prin îndepărtarea soluției substrat și spălarea cu apă distilată (fig. 16). Incintele de cultivare au fost îndepărtate de pe lamă (fig. 17) iar lama a fost montată cu mediu de montare peste care s-a adăugat o lamelă.



Fig. 16. Opiria reacției prin spălare cu apă distilată



Fig. 17. Desprinderea incintelor de diferențiere de pe lama de sticlă

2. Imunolocalizarea Colagenului Tip I

După îndepărtarea mediului de cultură și limpezirea incintelor cu ser Ringer la 4⁰C, celulele au fost fixate cu aldehydă formică 4% tamponată cu 10mM de fosfat pH-ul soluției fiind de 6.9, la 4⁰C timp de 10 minute (fig. 18). Culturile fixate au fost spălate cu apă distilată rece și lăsate să se usuce (fig. 19).

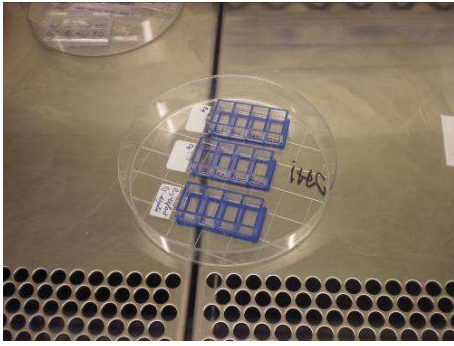


Fig. 18. Fixare celulelor

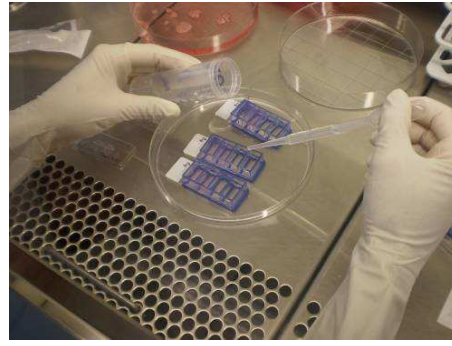


Fig. 19. Spălarea culturilor fixate

Culturile au fost incubate timp de 30 de minute cu serul de blocare (COL1A1 (D-13): sc-25974 *Santa Cruz Biotechnology Inc*) (fig. 20). După spălarea serului de blocare cu PBS a fost adăugat al doilea ser de blocare nespecifică celulele fiind incubate încă 30 de minute, apoi culturile au fost spălate cu PBS și s-a adăugat Streptavidin peroxidază conjugată (fig. 21) urmând încă o perioadă de 30 de minute de incubație, urmată de o incubație de 10 minute cu DAB in substrat de peroxidază.

După spălarea cu apă de robinet și colorarea cu hematoxină, lamele au fost montate cu mediu de montare peste care s-a pus lamela de sticlă.



Fig. 20. Serul de blocare COL I A I

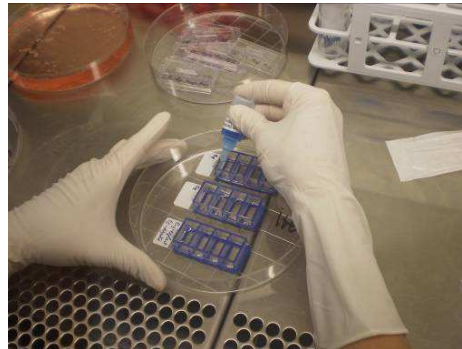


Fig. 21. Adăugarea Streptavidin peroxidazei

3. Mineralizarea matricei extracelulare

Prezența depozitului de fosfat a fost analizat histochimic prin reacția Von Kossa, depozitele de fosfat de calciu detectate apar colorate în negru. Culturile celulare au fost clătite de mediul de cultură cu ser Ringer la 4°C și fixate cu aldehydă formică 4% tamponată cu 10 mM fosfat, pH-ul soluției fiind 6.9, la 4°C timp de 10 minute.

După îndepărtarea fixatorului celulele au fost spălate cu apă distilată rece și acoperite cu nitrat de argint 5% (fig. 22) și menținute la întuneric 30 de minute. După îndepărtarea nitrului de argint celulele s-au clătit cu apă distilată, apoi s-a adăugat, timp de 2 minute, o soluție de carbonat de sodiu și aldehydă formică, (5g Na₂CO₃ în 75 ml apă distilată la care se adaugă 25 ml aldehydă formică 36%).

Culturile au fost clătite cu apă distilată timp de 10 minute, urmând o perioadă de 20 de minute de incubare cu o soluție care conține o parte soluție apoasă 10% ferocianură de potasiu și nouă părți soluție 10% tiosulfat de sodiu.

Dupa incubare a urmat o noua clătire a culturilor celulare cu apă distilată care au fost lăsate să se usuce, după care incintele de cultivare au fost îndepărtate de pe lama de sticlă (fig. 23), aceasta fiind montată cu mediu de montare peste care s-a fixat lamela.

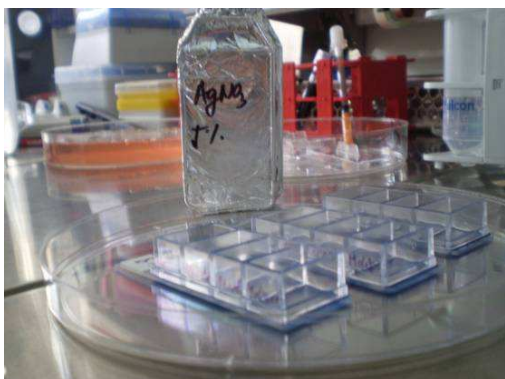


Fig. 22. Aspect permergător adăugării Nitratului de Argint 5%

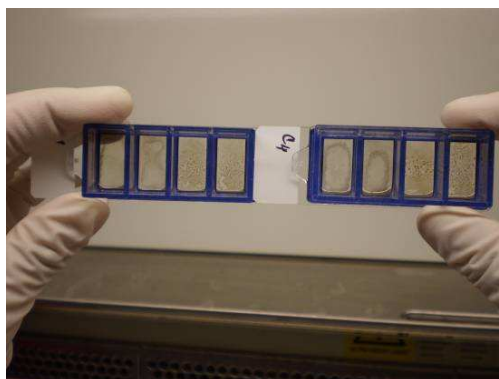


Fig. 23. Aspectul lamelor înainte de montare

REZULTATE

Suprafata de cultivare pusa la dispozitie pentru celulele obtinute prin ambele procedee de izolare a fost ocupata in totalitate pana in ziua a sasea.

Analiza caracterelor morfologice ale celulelor izolate din explant, la 4 (fig. 11), 5, 8 si 14 zile de cultivare (fig. 24, 25 si 26), a permis aprecierea viabilitatii lor si a ratei de multiplicare.

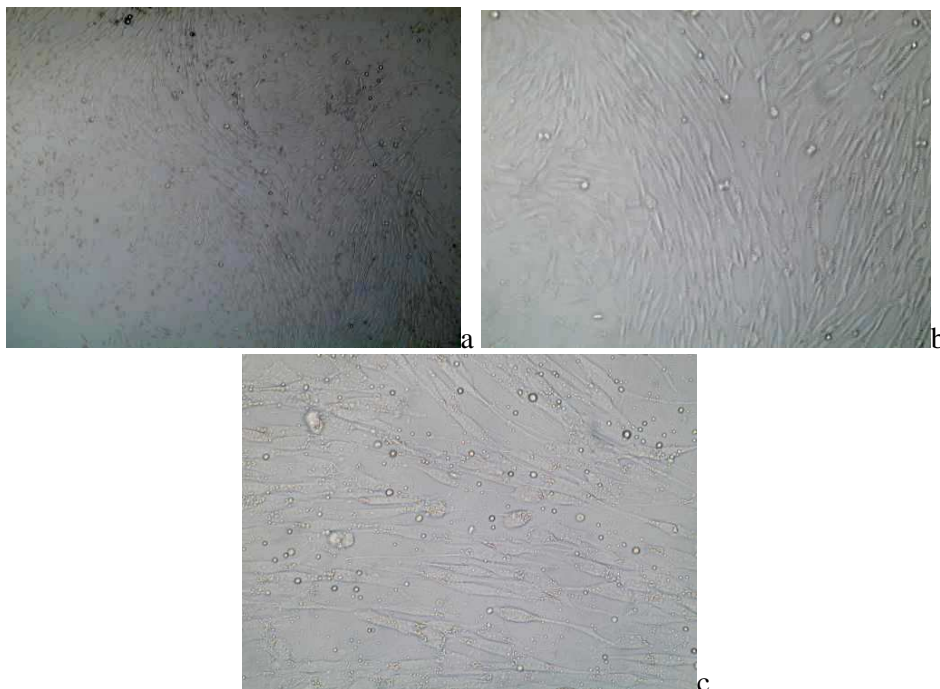


Fig. 24. Aspectul celulelor izolate din explant la 5 zile de la introducerea în mediul de cultură a) imagine cu obiectivul 10X, b) imagine cu ob. 20X, c) imagine cu ob. 40X



Fig. 25. Aspectul celulelor izolate din explant la 8 zile de la introducerea în mediul de cultură a) imagine cu obiectivul 6X, b) imagine cu ob. 20X, c) imagine cu ob. 40X

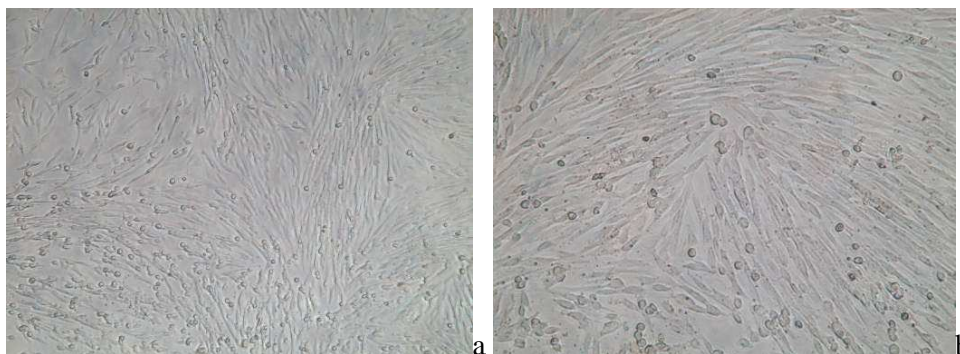


Fig. 26. Aspectul celulelor rezultate din explant la 14 zile de la introducerea în mediul de cultură, a) imagine cu obiectivul 10X, b) imagine cu obiectivul 20X.

Celulele periostale obținute în urma digestiei au prezentat o rata de multiplicare mai redusă decât celulele din explant. Din compararea imaginilor obtinute prin microscopie s-a observat ca celulele periostale izolate in urma digestiei au prezentat o densitate celulară mai redusă (fig. 12, 27, 28 si 29), situatie constatata la culturile celulare obtinute de la toti cei patru subiecti. Aceste caracteristici se păstrează și în ziua a 14-a de cultivare cu toate că în ambele cazuri viabilitatea celulară depășește 95%.

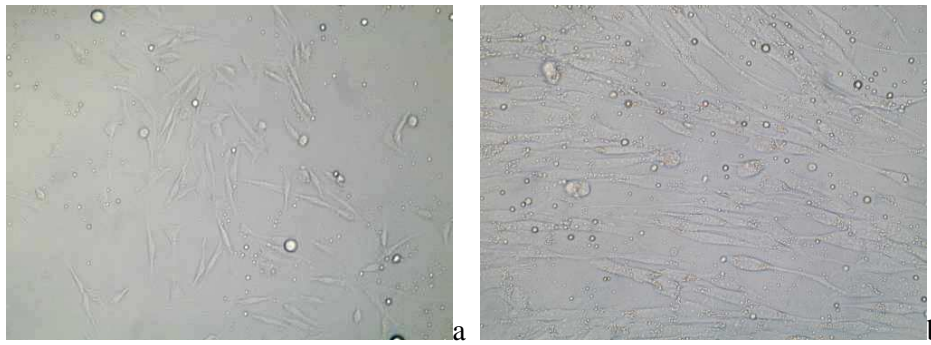


Fig. 27. Aspectul celulelor periostale obținute prin digestie la 5 zile de cultivare
a) imagine cu obiectivul 20X, b) imagine cu obiectivul 40X

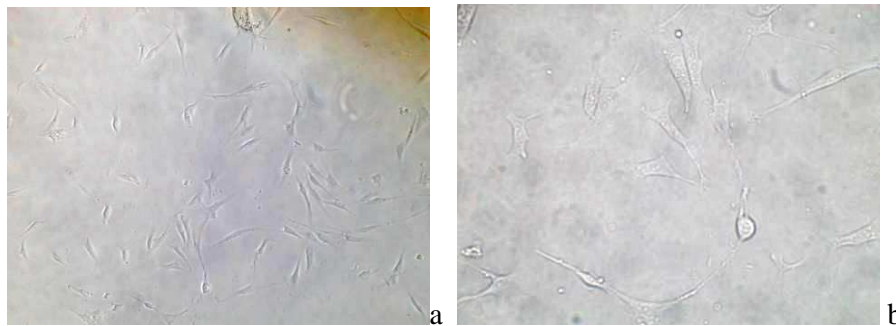


Fig. 28. Aspectul celulelor periostale obținute prin digestie la 8 zile de cultivare
a) imagine cu obiectivul 20X, b) imagine cu obiectivul 40X

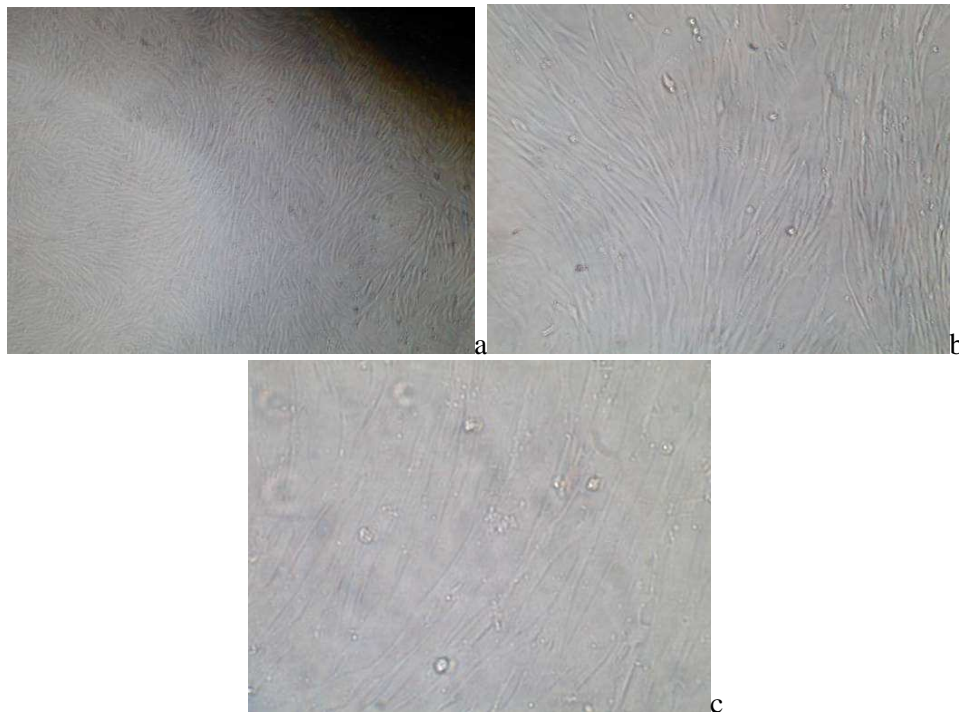


Fig. 29. Aspectul celulelor periostale obținute prin digestie la 14 zile de cultivare
a) imagine cu obiectivul 6X, b) imagine cu obiectivul 20X, c) imagine cu obiectivul 40X

Pentru toate culturile celulare rezultate atât din explant cât și în urma digestiei, pe parcursul perioadei de cultivare, morfologia celulară a fost asemănătoare fibroblastelor. Celulele sunt filiforme și prezintă aranjamente sub formă de vârtejuri.

În discurile de cultură au putut fi observate aglomerări de celule asemănătoare celulelor epiteliale, acestea fiind formate din celule fibroblastice independente grupate. Aceste aglomerări celulare sunt prezente în număr mai mare în culturile celulare obținute din explanturile periostale.

Înainte de crioconservarea culturilor celulare viabilitatea celulară a depășit proporția de 95%, dar numărul total al celulelor aflate pe aceeași suprafață de cultură a variat în limite foarte largi între cei patru indivizi (fig. 30, 31 și 32).

După decongelare viabilitatea celulelor a prezentat de asemenea, limite foarte largi dependent de individ precum și de numărul de celule introduse în criotuburi, aceste date sunt redată în tabelul 2.

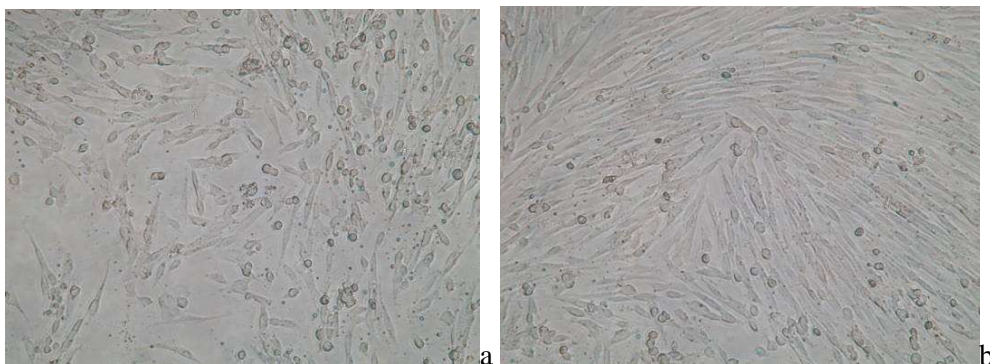


Fig 30. Aspectul culturilor celulare obținute din explant la 14 zile de cultivare, obiectivul 20X. a) subiect 1 b) subiect 3

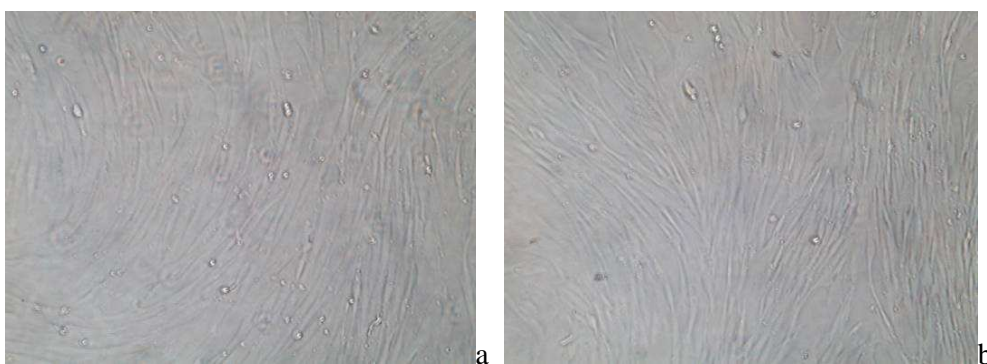


Fig. 31. Aspectul culturilor celulare obținute prin digestie la 14 zile de cultivare, obiectivul 20X. a) subiect 3 b) subiect 4

Tabel 2.

Numar de celule viabile inainte si dupa crioconservare

Subiect	Tip de izolare celulara	Nr. celule/ml înainte de congelare	Nr. celule/ml după decongelare
1	Explant	4,5 milioane	2,4 milioane
2		1,8 milioane	375.000
3		10,5 milioane	4 milioane
4		3,2 milioane	1,2 milioane
1	Digestie	4,5 milioane	3,5 milioane
2		3 milioane	870.000
3		3,2 milioane	2,5 milioane
4		2,8 milioane	1,1 milioane

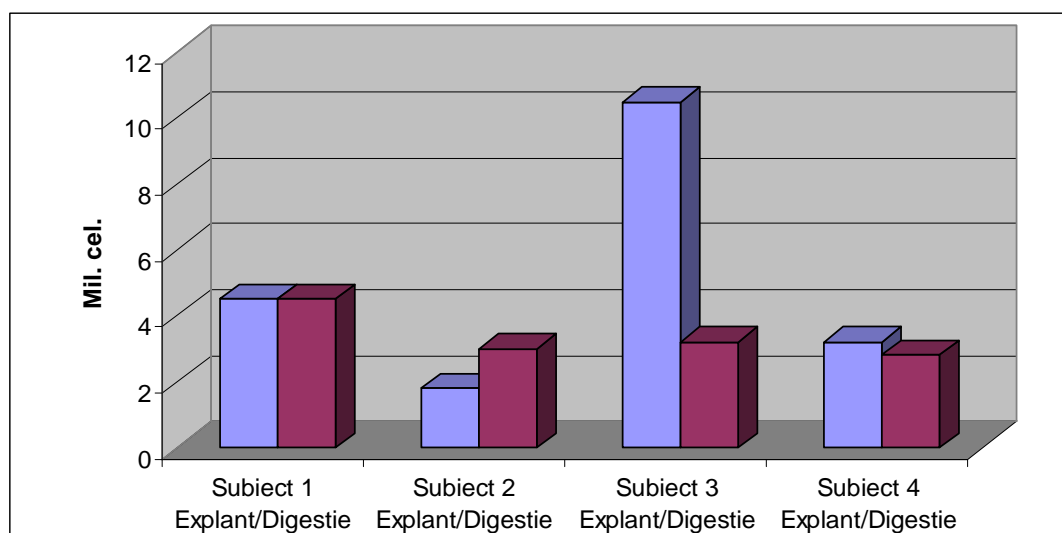


Fig. 32. Reprezentarea grafica a numarului de celule obtinute in urma cultivarii inainte de congelare

In urma analizei datelor prezentate sintetic in tabelul 2 s-a constatat scaderea numarului de celule viabile obtinute din explant cu 47-80% (fig. 33) iar in cazul celulelor obtinute prin digestie cu 22-81% (fig. 34) . Aceasta scădere a numărului de celule după decongelare este în directă legătură cu efectele nocive ale temperaturilor negative asupra citoplasmei celulare dar poate fi corelata și cu densitatea initiala celulelor in criotuburi.

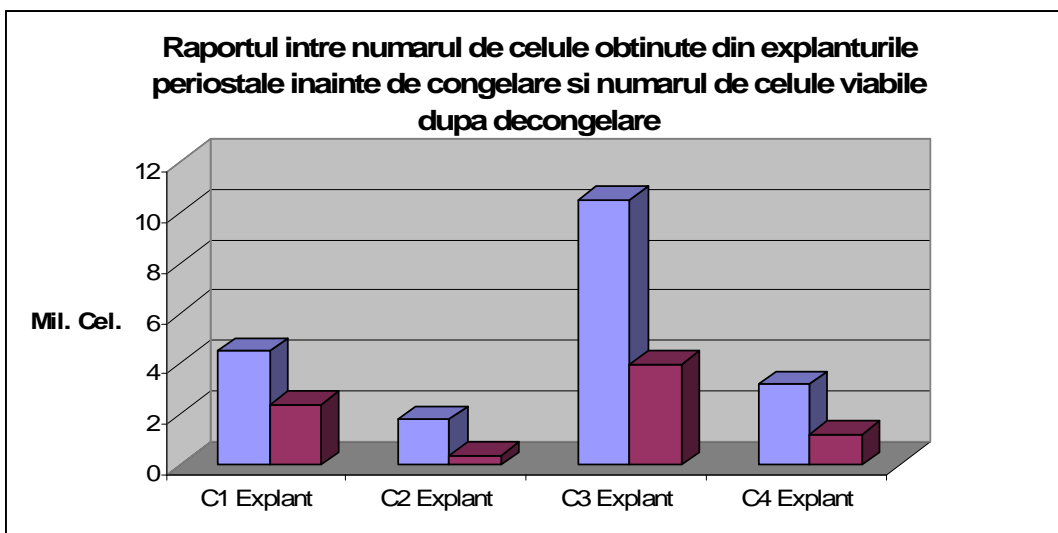


Fig. 33. Raportul dintre numarul de celule viabile provenite din explanturi - inainte si dupa decongelare

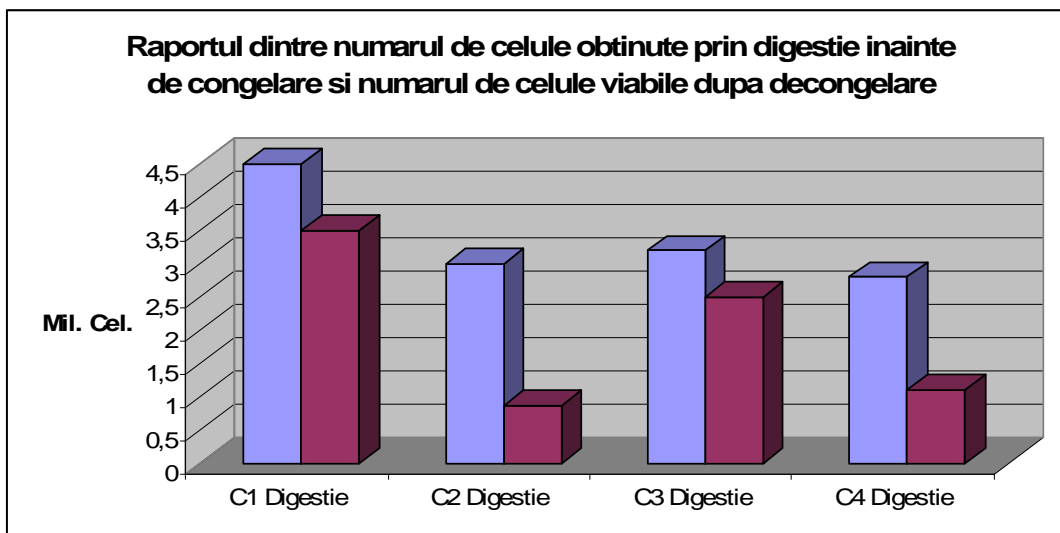


Fig. 34. Raportul dintre numarul de celule viabile provenite in urma digestiei - inainte si dupa decongelare

La examenul microscopic al celulelor din explant (obiectiv 10X, 20X și 40X) realizat după perioada de diferențiere, perioada în care celulele au fost menținute în suspensie cu mediu osteogenic, s-a observat ca celulele au formă poliedrică și ca multiplicarea lor în mediul de cultură s-a realizat mai mult pe verticală. În urma reacției pentru determinarea activității fosfatazei alcaline celulele s-au colorat intens ceea ce denotă o activitate intens pozitivă a fosfatazei alcaline (fig. 35), fenomen constatat la toți indivizii.

În cazul celulelor obținute din explant dar care în perioada de diferențiere au fost menținute în suspensie cu mediu DMEM (incinte martor) celulele sunt rotunde sau ușor fusiforme, caracter morfologic caracteristic fibroblastelor, caracteristici pe care aceste celule le-au avut și înainte de introducerea în incintele de diferențiere. În urma reacției pentru determinarea activității fosfatazei alcaline, celulele nu s-au colorat, observându-se resturi de colorant în spațiile dintre celule ceea ce denotă lipsa activității fosfatazice (fig. 36).

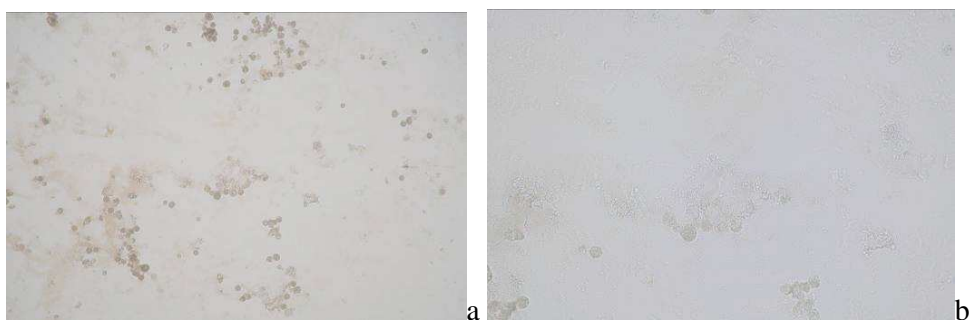


Fig. 35. Reacție pozitivă a celulelor din explant cultivate în incintele de diferențiere cu mediu osteogenic. a) imagine cu obiectivul 20X, b) imagine cu obiectivul 40X

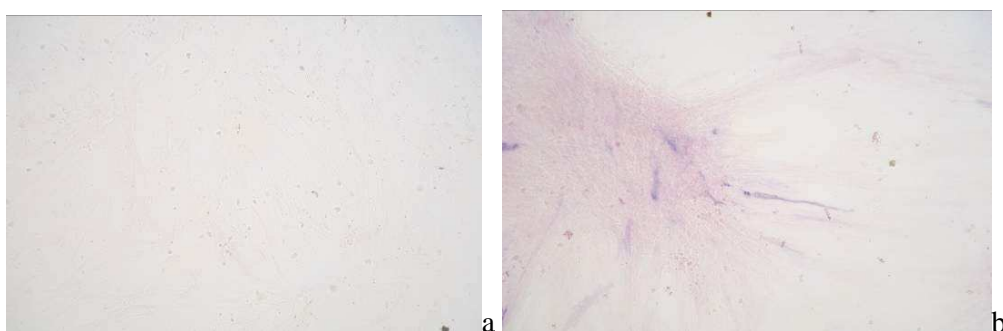


Fig. 36. Reacție negativă a celulelor din explant cultivate în incintele de diferențiere cu mediu DMEM. a) imagine cu obiectivul 20X, b) imagine cu obiectivul 40X

La examinarea microscopică a lamelor pe care au fost fixate celule periostale obținute în urma digestiei și care au fost menținute în suspensie cu mediu pentru osteoblaste în perioada de diferențiere, s-a observat că forma acestor celule este poliedrică, aproximativ cuboidală. În urma reacției pentru determinarea activității fosfatazei alcaline celulele prezintă activitate fosfatazică pozitivă (fig. 37) dar s-au colorat mai puțin intens decât celulele obținute din explant și diferențiate în același mediu.

Examinarea lamelor (martor) pe care se află celule obținute în urma digestiei dar care în perioada de diferențiere s-au aflat în suspensie cu mediul de cultură DMEM, a evidențiat forma rotundă ușor fusiformă a acestor celule, caractere specifice fibroblastelor. Reacția pentru identificarea activității fosfatazei alcaline nu a determinat nici o modificare de culoare în structura celulelor, fapt care corespunde lipsei activității fosfatazice (fig. 38).

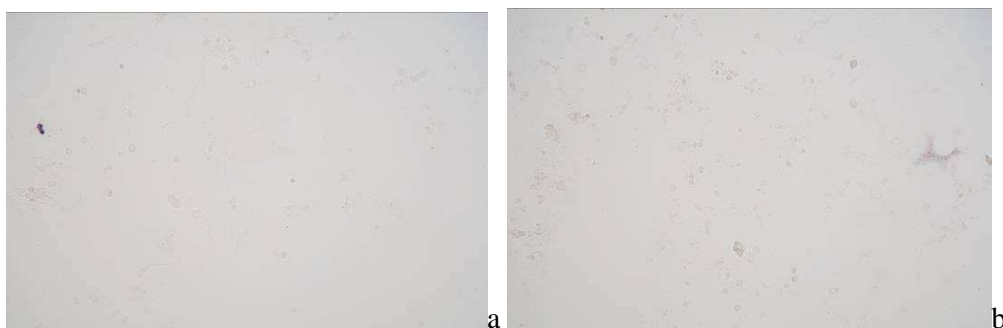


Fig. 37. Reacție pozitivă a celulelor obținute prin digestie cultivate în incintele de diferențiere cu mediu osteogenic. a) imagine obiectiv 20X, b) imagine ob. 40X

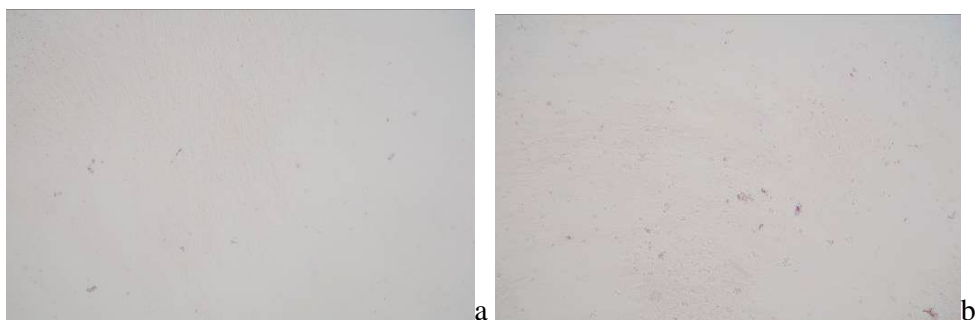


Fig. 38. Reacție negativă a celulelor obținute prin digestie cultivate în incintele de diferențiere cu mediu DMEM. a) imagine obiectiv 20X, b) imagine ob. 40X

Detectarea colagenului tip I, pe baza reacției imunohistochemice antigen anticorp, atât celulele din explant cât și cele obținute în urma digestiei din incintele experimentale și martor, a fost negativă (fig. 39 și 40). S-a constatat că nici o celulă nu a fixat hematoxilina, ceea ce ar fi avut semnificația unei reacții pozitive, pe lame observându-se celulele cu morfologie diferită dependent de tipul de mediu în care au fost menținute în timpul diferențierii precum și resturi de colorant.

Doar o lamă pe care se aflau celule din explant cultivate în incintele de diferențiere cu mediu DMEM (martor), de la subiectul trei a reacționat fals pozitiv. S-a considerat reacția ca fiind fals pozitivă deoarece a apărut doar la o margine a câmpului de cultură celulară, centrul câmpului nefiind colorat (fig. 41).

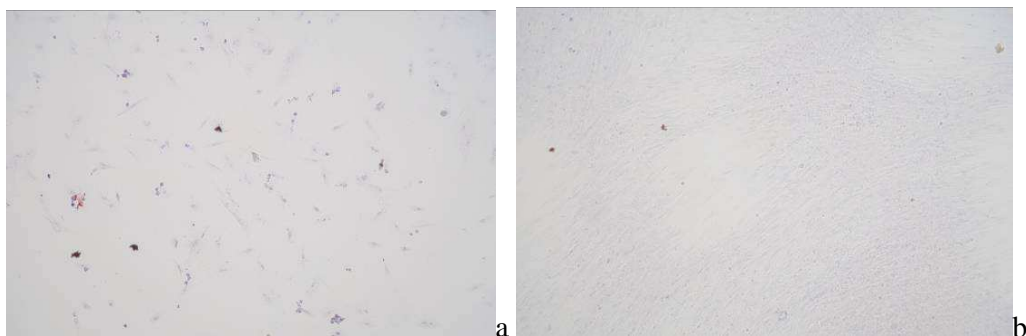


Fig. 39. Reacție de identificare a colagenului tip I negativă - celule din explant a) cultivate în mediu osteogenic (experimental), b) cultivate în mediu DMEM (martor), obiectiv 20X.

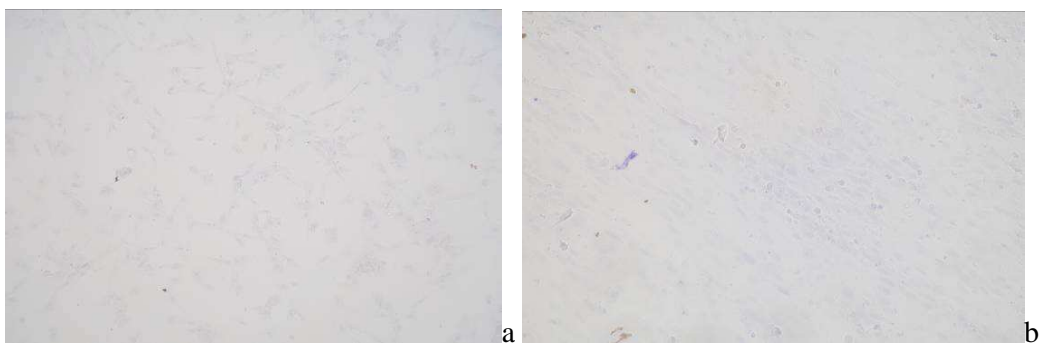


Fig. 40. Reacție de identificare a colagenului tip I negativă - celule obținute prin digestie a) cultivate în mediu osteogenic (experimental), b) cultivate în mediu DMEM (martor), obiectiv 20X.



Fig. 41. Reactie fals pozitivă a celulelor din explant cultivate în incintele de diferențiere cu mediu DMEM - martor, subiect 3, obiectiv 20X.

Prin reacția Von Kossa se pot pune în evidență Ca^{2+} , carbonații sau fosfații de Ca, sub forma de depozite intra- și extracelulare, depozite care apar colorate în brun sau negru, nucleii celulelor aparând colorați în roșu. Acest tip de depozite, intra- și extracelulare, fiind specifice celulelor cu activitate osteogenica.

La examinarea lamelor cu celule din explant (incinte experimentale) s-a observat colorarea uniformă, în toată masa celulară, și intensă a celulelor la care nucleul apare roșietic iar membrana celulară și zona învecinată colorată în negru. Depozitele de calciu mineralizat din interiorul celulelor care au capatat deja o formă poliedrică și din jurul lor denotă o activitate osteogenică pozitivă (fig. 42).

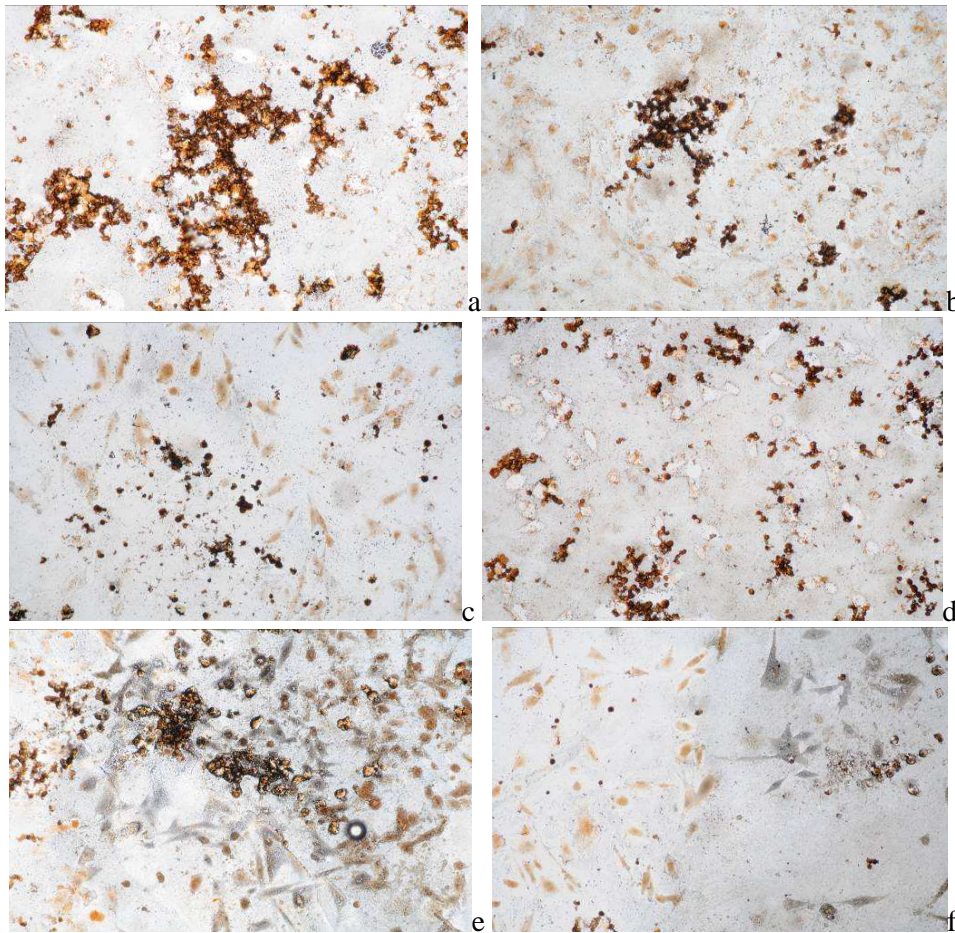


Fig. 42. Reactie pozitivă a celulelor obținute din explant - incinte experimentale.
 a) imagine obiectiv 10X, b si c) imagini obiectiv 20X,
 d, e, si f) imagini cu obiectiv 40X

Pe lamele cu celule din explant din incintele martor se observă doar colorarea intensă brun-roșcat a celulei fără depozite de calciu aspect caracteristic absenței activității osteogenice (fig. 43).

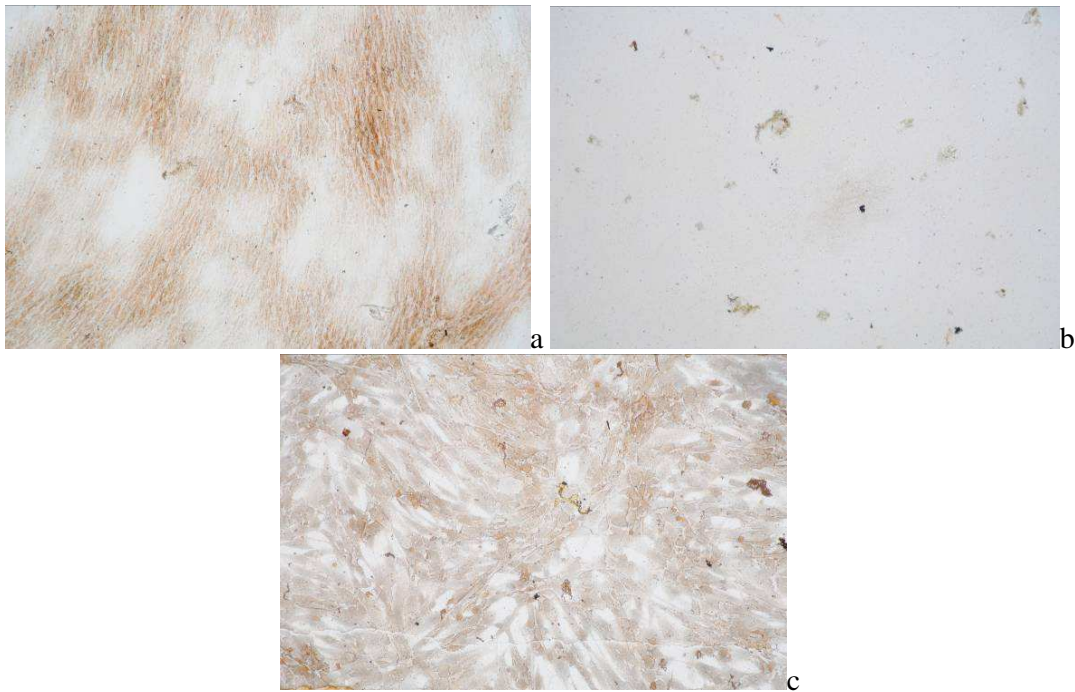


Fig. 43. Reacție negativă a celulelor obținute din explant – incinte martor.
a) imagine obiectiv 10X, b și c) imagini obiectiv 20X.

Examinarea lamelor cu celule obținute prin digestie din incintele experimentale a evidențiat celule intens colorate precum și prezența depozitelor de calciu în membrana celulară și în jurul celulelor, colorare ce caracterizează activitatea osteogenică intensă (fig. 44). La fel ca și în cazul lamelor cu celule provenite din explant și pe aceste lame s-a observat forma poliedrică a celulelor, tipică celulelor osteogenice.

Lamele cu celule obținute după digestie din incintele martor s-au colorat foarte puțin iar morfologic aceste celule au aspect fusiform specific fibroblastelor (fig. 45). Toate aceste caracteristici evidențiază lipsa activității osteogenice a celulelor.

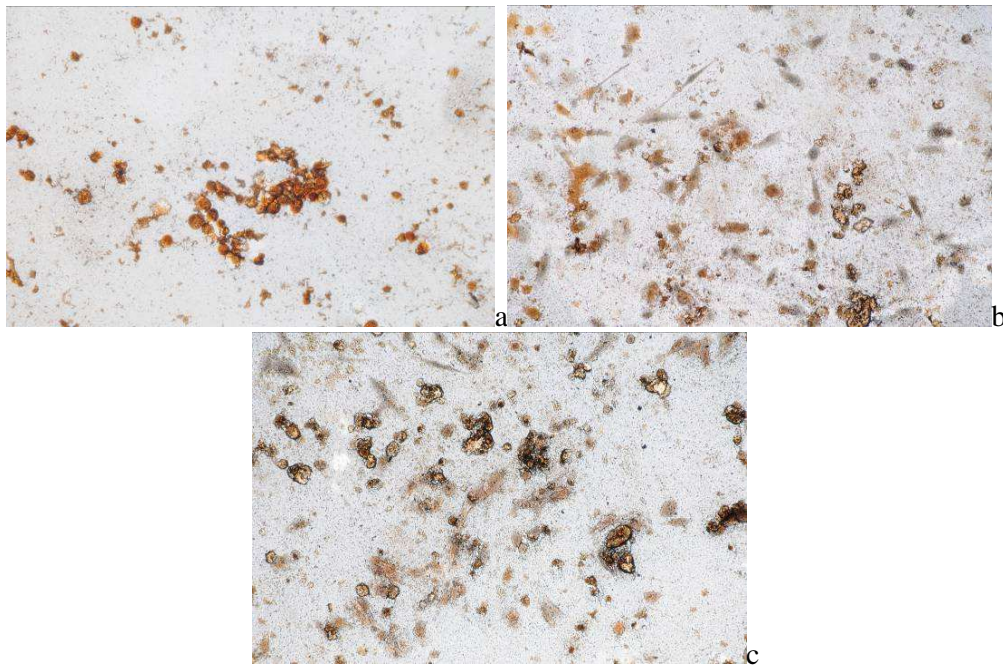


Fig. 44. Reacție pozitivă - celule obținute în urma digestiei incintei experimentale
 a) imagine cu obiectivul 10X, b) imagine cu obiectivul 20X, c)
 imagine cu obiectivul 40X

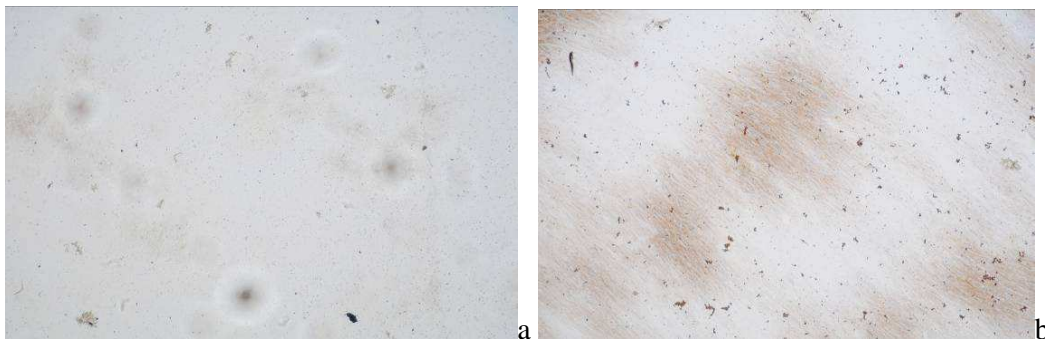


Fig. 45. Reacție negativă – celule-obținute în urma digestiei incintei martor
 a) imagine obiectiv 10X, b) imagine obiectiv 20X

Datele obținute în prezentul studiu demonstrează că metoda de cultivare pe mediu DMEM permite obținerea de o densitate celulară optimă pentru crioconservare și ulterior pentru menținerea numărului de celule la un nivel suficient pentru etapa de diferențiere. Pastrarea timp de 10 zile în incintele de diferențiere în mediu osteogenic, mediu care conține acid ascorbic, β – glicerofosfat și dexametazonă, reprezintă un interval de timp suficient dezvoltării directe spre linia osteogenică. Date asemănătoare au fost obținute de Groger și col., 2005, care a efectuat cercetările pe suine din rasele mici precum și de Uneo și col., 2007, care a folosit ca model experimental animal cobaiul. Ambele echipe de cercetători au utilizat același mediu de diferențiere însă durata perioadei de diferențiere a fost mai lungă, de aproximativ 14 zile.

Activitatea pozitivă a fosfatazei alcaline în cazul celulelor diferențiate spre osteoblaste sugerează o activitate osteogenică intensă. De asemenea, morfologia acestor celule, aspectul poliedric și cuboidal, precum și creșterea realizată și pe verticală în mediul de diferențiere sunt

caracteristici ale osteoblastelor. Confirmarea rezultatelor obtinute in urma analizei activitatii fosfatazei alcaline s-a obtinut si prin reactia Von Kossa prin care s-au pus in evidenta prezenta depozitelor de calciu in membrana celulelor precum si in vecinatatea acestora.

Lipsa reactiilor pozitive, la toti subiectii, in cazul testarii imunohistochimice de tip antigen anticorp poate fi atribuita lipsei de reactie a anticorpului anticolagen I folosit cu colagenul de origine canina. Acest anticorp (COL1A1 (D-13): sc-25974 *Santa Cruz Biotechnology Inc*) reactioneaza primar cu colagenul de origine caprina, umana si murin fiind considerat de asemenea, reactiv si cu alte mamifere printre care si cainele.

Metodele de izolare si diferentiere folosite s-au dovedit eficiente pentru obtinerea de celule periostale care si-au dezvoltat capacitatea osteogenica, capacitate probata prin rezultatele examenelor histochimice si in urma examenului morfologic.

CONCLUZII

Analiza densitatii celulelor viabile obtinute dupa decongelare indica ca o densitate de aproximativ 4,5 mil. de celule/criotub (1,8 ml) asigura un numar satisfactor de celule viabile dupa decongelare.

Pastrarea timp de 10 zile in incintele de diferentiere asigura intervalul de timp suficient dezvoltarii capacitatii osteogenice.

Demonstrarea capacitatii osteogenice a celulelor diferentiate se face in mod suficient prin coroborarea analizei morfologice cu rezultatele testelor histochimice, mai exact a activitatii fosfataze si a prezentei depozitelor de calciu.

Pentru identificarea colagenului de tip I este necesar un anticop anticolagen specific care sa reactioneze primar cu colagenul canin.

Bibliografie selectiva

1. A. Groger, S. Klaring, HA. Merton și col., Tissue engineering of bone for mandibular augmentation in immunocompetent minipigs, *Scandinavian journal of plastic and reconstructive surgery and hand surgery*, vol. 37, pag. 129 – 131, 2003.
2. A. Redilch, C. Perka, O. Schultz și col., *Bone engineering on the basis of periosteal cells cultured in polymer fleeces*, *Journal of materials Science: Materials in Medicine*, vol. 10, pag. 767 – 772, 1999.
3. A. Takushima, Y Kitamo și K. Harii, *Osteogenic potential of cultured periosteal cells in a distracted bone gap in rabbits* *Journal of Surgical Research*, vol 37, pag. 68 - 77, 1998.
4. B.W. Park, J.H. Byun, SG. Lee și col., Evaluation of osteogenic activity and mineralization of cultured human periosteal – derived cells, *Journal of Korean Association of Maxillofacial Plastic and Reconstructive Surgeons*, vol 28 (6), pag. 511 – 519, 2006.
5. C. Jaquier, S. Schaeren și col., In vitro osteogenic differentiation and in vivo bone forming capacity of human iogenic jaw periosteal cells and bone marrow stromal cells, *Annals of Surgery*, vol. 242, pag. 859 – 868, 2005.
6. G. Augustin, A. Antabak, S. Davila, The periosteum Part 1: Anatomy, histology and molecular biology *International journal of the Care of the Injury*, Volume 38, Issue 10, Pages 1115-1130, 2007

7. *H. Agata, M.Uchida și col.*, Effective bone engineering with periosteum derived cells, [Journal of Dental Research](#) vol. 86 (1), pag. 79 – 83, 2007
8. *Heidi Andrea Declercq, Leo Isabelle De Ridder, Maria Jozefa Cornelissen*, Isolation and osteogenic differentiation of rat periosteum-derived cells; *Cytotechnology* 49 pag. 39-50, 2005.
9. *I. Gerber și I. ap Gwynn*, Influence of cell isolation, cell culture density, and cell nutrition on differentiation of rat calvarial osteoblast – like cells in vitro, *European Cells and Materials*, vol. 2, pag. 10 – 20, 2001
10. *J. Borys, SZ. Grabowska și col.*, Collagen type I and III metabolism in assessment of mandible fractures healing, *Roczniki Akademii Medycznej w Białymstoku*, vol 49, pag. 237- 245.
11. *J. Fang and B. K. Hall*, In vitro differentiation potential of the periosteal cells from a membrane bone, the quadrarogal of the embryonic chick, *Developmental Biology*, vol. 180, pag. 701- 712, Article no:0339, 1996
12. *LF. Bonewald, SE. Haris și col.*, Von Kossa stining alone is not sufficient to confirm that mineralization in vitro represents bone formation, [Calcified Tissue International](#), vol 72 (5), pag. 537 – 547, 2003.
13. *M. Dengshun, A. Scutt*, Histochemical localization of alkaline phosphatase activity in decalcified bone and cartilage, *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* vol.50 (3), pag. 333 – 340, 2002.
14. *R. Cancedda, P. Castagnola și col.*, Developmental control of chondrogenesis and osteogenesis, [International Journal of Developmental Biology](#), vol. 44, pag. 704 – 714, 2000.
15. *R. Shedden, Jane Dunham, Lucille Bitensky, A. Catterall, and J. Chayen*, Changes in alkaline phosphatase activity in periosteal cells in healing fractures, [Calcified tissue research](#), vol. 22, pag 19 – 25, 1976.
16. *T. R. Yoon, Y. S. Lee, E. J. Jung, Y. J. Roh E. K. Song, J. K. Seon*, Osteogenic function of periosteum and periosteal cells of rabbit, 52nd Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, Paper No:0975, 2006.
17. *Uchida Atsumasa, Kikuchi Toshiyuki, Shimomura Yutaka*, Osteogenic capacity of cultured human periosteal cells; *Acta Orthop Scand* 59 (1), pag 29-33, 1988.
18. *Ueno Takaaki și col.*, Evaluation of osteogenic potential of cultured periosteum derived cells – preliminary animal study, *Journal of Hard Tissue Biology* vol 16 (2), pag. 50 – 53, 2007.
19. *Wu Xiaohong, Lin Minkui și col.*, Effects of DMEM and RPMI 1640 on the biological behavior of dog periosteum derived cells, *Cytotechnology*, vol.59, pag. 103 – 111, 2009
20. *Yi-xiong Zheng și col.* Osteogenic potential of human periosteum-derived progenitor cells in PLGA scaffold using allogeneicserum, *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, vol. 7 (10), pag. 817 – 824, 2006.

1.4. Diseminare rezultate obiectiv 1/2009

Lucrari prezentate la simpozioane stiintifice nationale

1. Igna Cornel - Comparative Studies Between Dynamic Compression Plate (Dcp) And Low-Contact Dynamic Compression Plate (LCDCP), Simpozion stiintific USAMV "Ion Ionescu de la Brad" Iasi, 2009, 52(11), p. 609-611.
2. Igna C., Schuszler Larisa, Seres Monica, Sabau Marius, Dascalu Roxana, Luca C., Sala A. - The Approach Of The Periosteum Components As Promoters For Osseous Regeneration Process, Simpozion stiintific USAMV "Ion Ionescu de la Brad" Iasi, 2009, 52(11), p. 612-615.
3. Cornel Igna, Larisa Schuszler, Calin Luca, Roxana Dascalu, Marius Sabau - Capacity of guiding osseous regeneration: periosteum versus mesenchymal stem cells, Simpozion stiintific international USAMV Cluj-Napoca 2009, sub tipar
4. Larisa Schuszler, C. Igna - Options for perioperative pain management in small animals, Simpozion stiintific USAMV "Ion Ionescu de la Brad" Iasi, 2009, 52(11), p. 762-766.
5. Larisa Schuszler, Cornel Igna, Aurel Sala, Roxana Dascalu, Marius Sabau, Calin Luca - Hypothermia prevention during anesthesia in major surgery in dog, Simpozion stiintific international USAMV Cluj-Napoca 2009, sub tipar