



## FIȘĂ METODĂ

### *Protocol evaluare potențial osteogenic*

**Scop:** Evaluarea potențialului osteogenic al filmelor subțiri de hidroxiapatită co-dopată.

**Scurtă descriere:** Este o metodă cantitativă bazată pe analiza calitativa a ALP (fosfataza alcalina) produsă de celule osteogenice (stem mezenchimale-*MSC* induse să diferențieze osteogenic sau osteoblaste) crescute pe filmele subțiri de hidroxiapatită. Aceasta metodă poate fi utilizată în combinație cu colorația cu alizarin-red, ceea ce permite evaluarea cantitativă a mineralizării în osteoblaste.

Substraturile (cu diametre de până la 12 mm) acoperite cu filme subțiri bioceramice, sunt sterilizate uscat și sunt transferate în hota de culturi celulare în godeuri ale plăcii cu 24 godeuri. Se însămânțează  $10^4$  celule *MSC* sau osteoblaste / $\text{cm}^2$  în fiecare godeu. *MSC* sunt induse să diferențieze osteogenic prin folosirea de mediu de diferențiere (DMEM suplimentat cu 10% ser fetal bovin, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  acid ascorbic, 0,1  $\mu\text{M}$  dexametazonă și 10 mM  $\beta$ -glicerofosfat). Mediul se înprospătează la fiecare 2 zile. Analiza potențialului osteogenic se poate analiza după 6 zile prin colorarea ALP, ideal între 7 și 14 zile. Probe lucrute în paralel vor fi folosite pentru colorație cu alizarin-red. Probele se lucrează în triplicat și se vor realiza minim 2 experimente independente (12 pastile acoperite cu filme subțiri sunt minim necesare pentru fiecare tip de film).

#### **Echipamente si materiale utilizate:**

- Unitate de culturi celulare (hotă cu flux laminar de aer, incubator cu  $\text{CO}_2$ , centrifugă cu răcire, microscop inversat, camera de numărare celule (hemocitometru), frigider ( $+4^\circ\text{C}$ ), congelator ( $-20^\circ\text{C}$ ), freezer ( $-80^\circ\text{C}$ ), rezervor cu azot lichid, pipete automate cu volum reglabil și vârfuri sterile, pipetor, pipete serologice sterile, recipiente pentru culturi celulare (flaskuri, plăci cu godeuri);
- Linii celulare: celule stem mezenchimale umane sau celule osteoprogenitoare, medii de cultură adaptate liniei celulare;
- Kit pentru colorație ALP, microscop optic cu cameră digitală;
- Pentru colorație cu alizarin-red: alizarin red S, acid acetic, spectrofotometru pentru plăci cu filtru de 405 nm.

#### **Principale caracteristici:**

- Metoda se poate aplica pentru tipuri variate de biomateriale condiționate ca: pulberi biomateriale, pastile biomateriale, filme biomateriale, nanoparticule;
- Metoda se poate aplica pentru diferiți timpi de expunere a celulelor la biomateriale (optim 7 sau 14 zile);
- Rezultatele metodei sunt calitative (ALP) și cantitative (alizarin Red).

**Informația dobândită:** Potențialul osteogenic al biomaterialelor.