PŘÍLOHA

Zpráva z testování biokompatibility, proliferace a diferenciace Saos-2 buněk na 3D tisknutých nosičích

Z VUT bylo přijato k testování 10 vzorků, 3 planární, 7 3D tištěných. Vzorky byly sterilizovány 70% etanolem.

Nosiče byly osazeny Saos-2 osteosarkomovou linií a byla měřena metabolická aktivita a proliferace. Dále byla sledována osteogenní diferenciace pomocí měření aktivity alkalické fosfatázy a mineralizace. Buněčná adheze a proliferace na nosičích byla sledována pomocí konfokální mikroskopie.

Testované vzorky:

Planární vzorky 3 ks:

RP9_Pl RP10_Pl RP15_Pl

3D tisk 7 ks:

RP9_3D RP10_3D RP11_3D RP12_3D RP13_3D

RP14_3D RP15_3D

Jako kontrola byly použity Saos-2 buňky nasazené ve stejné koncentraci na kultivační plast (kontrola kondice buněk). Kultivační plast je ošetřen a optimalizován pro buněčnou adhezi a růst, tudíž je normální, když jsou hodnoty naměřené na vzorcích stejné, nebo nižší.

1. Metody

1.1 Sterilizace a osazení nosiče buňkami

Nosiče byly sterilizovány 70% etanolem po dobu 30 min a následně 3× opláchnuty sterilním fosfátovým pufrem (PBS). Sterilní vzorky o průměru 6 mm byly vloženy do 96-jamkové destičky. Následně bylo přidáno 2×10^4 Saos-2 buněk ve 20 µl kultivačního diferenciačního média. Diferenciační médium sestávalo z McCoy‘s média (Sigma Aldrich) obohaceného o 15% fetálního bovinního séra (FBS), 1% antibiotika (100 U/ml penicillinu a 100 µg/ml streptomycinu; Sigma Aldrich), 10nM dexametazon (Medochemie), 2mM betaglycerolfosfát (Sigma Aldrich) a 50 µl/ml askorbát-2-fosfát (Sigma Aldrich). Buněčná adheze v tomto malém množství média byla umožněna po dobu 2 hodin v inkubátoru, aby nedošlo k odplavení buněk mimo vzorek. Po adhezi bylo médium doplněno do 250 µl na jamku. Osazené nosiče byly kultivovány po dobu 21 dní v inkubátoru s vysokou vlhkostí vzduchu a 5 % CO_2 při 37°C. Kultivační médium bylo měněno 2 × týdně.

1.2 Test metabolické aktivity

MTS test (CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay; Promega) byl použit na stanovení metabolické aktivity buněk. Vzorky byly přeneseny do čistých jamek 96-jamkové destičky (aby nedošlo k ovlivnění hodnot buňkami, které rostly na dně kultivačních jamek pod vzorkem). Následně bylo přidáno 20 µl roztoku MTS a 100 µl čerstvého kultivačního média. U kontrolní skupiny bylo pouze odsáto médium a nahrazeno roztokem MTS (20 µl) a čerstvým médiem (100 µl). Vzorky byly inkubovány v roztoku 2 hod v inkubátoru při 37°C. MTS substrát je metabolizován mitochondriálními enzymy na fialový formazán, který absorbuje světlo při 490 nm. Po 2 hod inkubace vzorků v substrátu bylo 100 µl roztoku přeneseno do čistých jamek a byla změřena absorbance pomocí spektrofotometru Infinite M200 PRO (Tecan, Switzerland) při 490 nm a referenční vlnové délce 690 nm. Od naměřených hodnot byla ještě odečtena hodnota naměřená na samotném vzorku

inkubovaném bez buněk, u kontrolních buněk na kultivačním plastu byla odečtena hodnota naměřená u kultivačního média s MTS.

1.3 Detekce buněčné proliferace

K určení buněčné proliferace byla použita kvantifikace buněčné DNA. Vzorky byly analyzovány pomocí kitu Quant-iT™ dsDNA Assay Kit (Life Technologies). Vzorky byly po změření MTS vloženy do 200 µl lyzačního pufru (0,2% v/v Triton X-100, 10 mM Tris (pH 7,0), a 1 mM EDTA) a byly lyzovány pomocí 3 cyklů zmražení/rozmražení, mezi nimiž byly důkladně vortexovány. Při analýze bylo 20 µl buněčného lyzátu od každého vzorku přidáno ke 200 µl reakčního roztoku, který se váže ke dvoušroubovicové DNA a následně emituje fluorescenční signál. Intenzita fluorescenčního signálu byla změřena pomocí fluorescenčního readru (Infinite M200 PRO, Tecan, Switzerland; λex= 485 nm, λem= 523 nm). Výsledky byly vyhodnoceny pomocí kalibrační křivky, která je součástí kitu.

1.4 Vizualizace buněčné distribuce v nosičích

Distribuce buněk na vlákenných nosičích byla vizualizována pomocí konfokální mikroskopie. Vzorky byly fixovány mraženým metanolem (-20°C) 10 min. Následně byla přidána fluorescenční sonda 3,3'-diethyloxacarbocyanine jodid (DiOC6(3), Invitrogen, 1 µg/ml v PBS (pH 7,4), která barví intracelulární membrány, a inkubována se vzorky 30 min při pokojové teplotě. Poté byl přidán propidium jodid (PI; 5 µg/ml v PBS, 5 min RT; Sigma Aldrich), který je interkalován do buněčné DNA. Následně byly vzorky opláchnuty PBS, a vizualizovány pomocí konfokálního mikroskopu (Zeiss LSM 880 Airyscan). Použité vlnové délky λex = 488 nm a λem = 520 nm pro DiOC6(3) a λex = 560 nm a λem = 580 nm pro propidium jodid. Obrázky získané z konfokální mikroskopie byly dále použity pro analýzu hloubkové penetrace buněk. Pomocí softwaru Zeiss Zen byla jednotlivým snímkům z různé hloubky nosiče přiřazena barva, která odpovídá barvě na škále publikované v obrázku.

1.5 Měření aktivity alkalické fosfatázy

Aktivita alkalické fosfatázy (ALP) byla měřena jako ukazatel osteogenní diferenciace. Nosiče byly opláchnuty v PBS. Následně k nim bylo přidáno 100 µl ALP substrátu (p-Nitrophenyl Phosphate Liquid Substrate Systém; Life Technologies), s ním se buňky nechaly inkubovat patnáct min při pokojové teplotě, ve tmě. Během inkubace ALP katalyzuje hydrolýzu bezbarvého ρ-nitrofenylfosfátu (pNPP) na ρ-nitrofenol, který má absorbanci při vlnové délce 405 nm. Po inkubaci se přepipetovalo 66,6 µl do nové destičky a do každé jamky bylo přidáno 33,3 µl 2M roztoku NaOH, který zastavil celou reakci. Vzniklý ρ-nitrofenol byl detekován na readeru Synergy HT při vlnové délce 405 nm. Od jednotlivých hodnot byla odečtena absorbance ALP substrátu s buněčným nosičem bez buněk.

1.6 Mineralizace nosičů

K detekci mineralizace nosičů byl použit kit Alizarin Red S Staining Quantification Assay (ARed-Q; ScienCell). Alizarin Red S tvoří komplex s vápenatými sloučeninami v chelatačním procesu a výsledkem je jasně červený produkt. Vzorky po měření aktivity ALP byly nejprve 3× opláchnuty PBS a poté fixovány ve 3,6% formaldehydu (v PBS) 15 min při RT. Po odstranění formaldehydu byly vzorky 3× opláchnuty v dH_2O. dH_2O byla odstraněna a bylo přidáno 0,1 ml 40mM ARS na jednu jamku. Inkubace probíhala 20 min při jemném třepání, RT. Následně byly vzorky důkladně propláchnuty v dH_2O, až do chvíle, kdy nebyla voda zbarvena. Nakonec byly vzorky vyfoceny.

1.7 Statistika

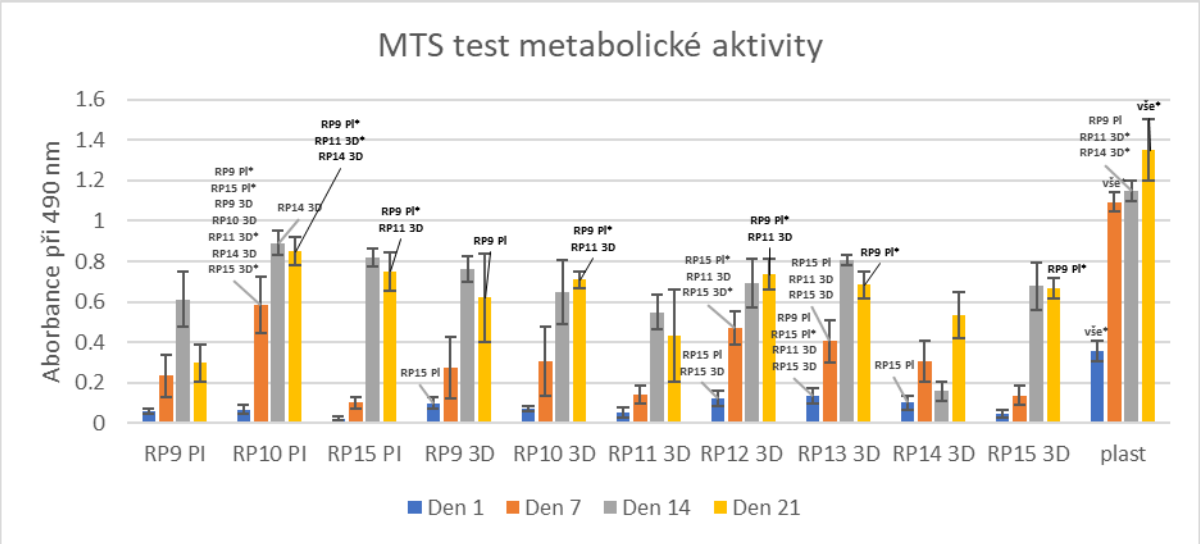
Pro všechny testy bylo použito 6 nezávisle připravených vzorků. Díky velkým odchylkám byly u některých vzorků odstraněny krajní hodnoty, avšak pro statistické hodnocení byly použity vždy nejméně 4 hodnoty. Data jsou prezentována jako průměr ± směrodatná odchylka (SD). Výsledky byly statisticky vyhodnoceny pomocí software GraphPad Prism 9.1.1. Pokud data prošla testem normality

a testem rovnosti rozptylů, byla provedena párová analýza pomocí testu ANOVA a Tukeyho srovnávacího testu pro post-hoc analýzu. Pokud data byla bez normální distribuce, byla párová analýza provedena pomocí Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks a Dunnova testu vícenásobného srovnání pro post hoc analýzu. Všechny výsledky byly považovány za statisticky významné, pokud p bylo <0,05.

2. Výsledky

2.1 Test metabolické aktivity

Metabolická aktivita byla měřena pomocí MTS testu 1., 7., 14. a 21. den experimentu (Obr. 1). Nejvyšší metabolická aktivita 24 hod po nasazení buněk na nosiče byla sledována na kultivačním plastu, dále pak u skupiny RP13 3D a RP12 3D. Nejvyšší metabolická aktivita 7. den experimentu byla naměřena na kultivačním plastu, dále pak u skupiny RP10 Pl, a o něco nižší u skupin RP12 3D a RP13 3D. 14. den byla metabolická aktivita vyrovnaná u většiny vzorků, včetně kultivačního plastu. Nižší hodnoty v porovnání s plastem byly naměřeny u skupiny RP11 3D, RP14 3D a RP9 Pl. Nejnižší metabolická aktivita v průběhu celého experimentu byla sledována u skupiny RP14 3D. U skupin RP15 Pl a RP15 3D byly nižší hodnoty naměřeny v začátku experimentu. 14. den byla už ale metabolická aktivita vyrovnaná s ostatními skupinami včetně kultivačního plastu. 21. den byla nejnižší metabolický aktivita naměřena na vzorku RP9 Pl a RP14 3D. Nižší v porovnání s většinou skupin byla i na vzorku RP11 3D. Na ostatních skupinách byla absorbance vyrovnaná, ovšem statisticky nižší než u kultivačního plastu.

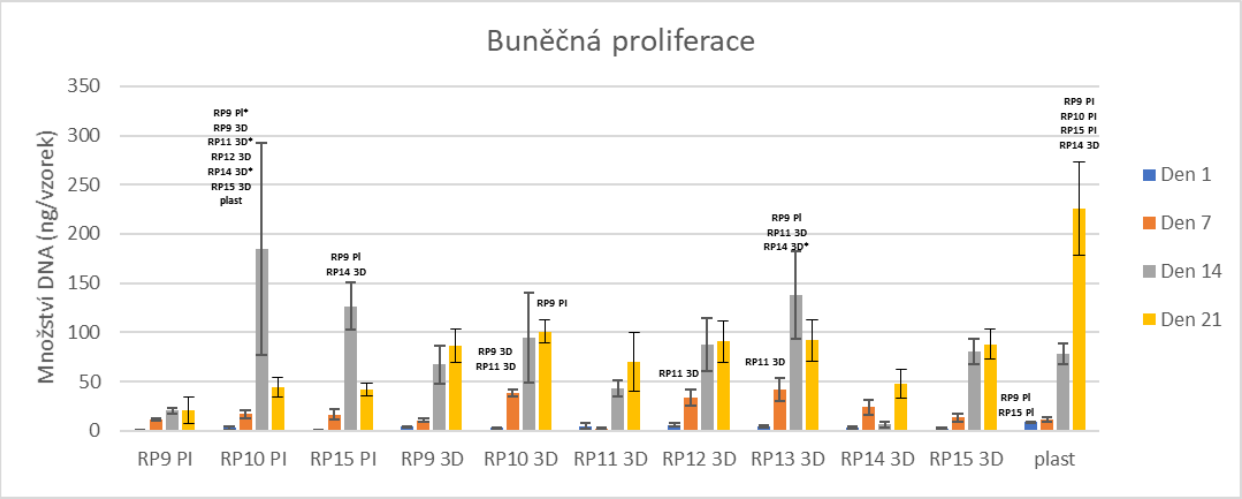


*Obr. 1: Metabolická aktivita buněk na 3D tisknutých nosičích měřená pomocí MTS. Jako kontrola byly použity Saos-2 buňky nasazené na kultivačním plastu (plast). Označení skupin nad sloupci značí statisticky významné rozdíly (p<0.05, * p<0.001).*

2.2 Měření buněčné proliferace pomocí kvantifikace DNA

Buněčná proliferace na 3D tisknutých nosičích byla měřena pomocí kvantifikace buněčné DNA (Obr. 2). Nejvyšší množství buněk 24 hod po nasazení bylo sledováno na kultivačním plastu, na ostatních skupinách byly hodnoty vyrovnané. 7. den bylo nejvíce buněk zaznamenáno na nosičích RP10 3D, RP12 3D a RP13 3D. 14. den došlo k výraznému nárůstu počtu buněk na RP10 Pl, dále pak na RP13 3D a RP15 Pl a to dokonce v porovnání s kultivačním plastem. 21. den nedocházelo k nárůstu počtu

buněk, naopak u planárních skupin došlo k jeho poklesu. Největší množství buněk bylo na kultivačním plastu.



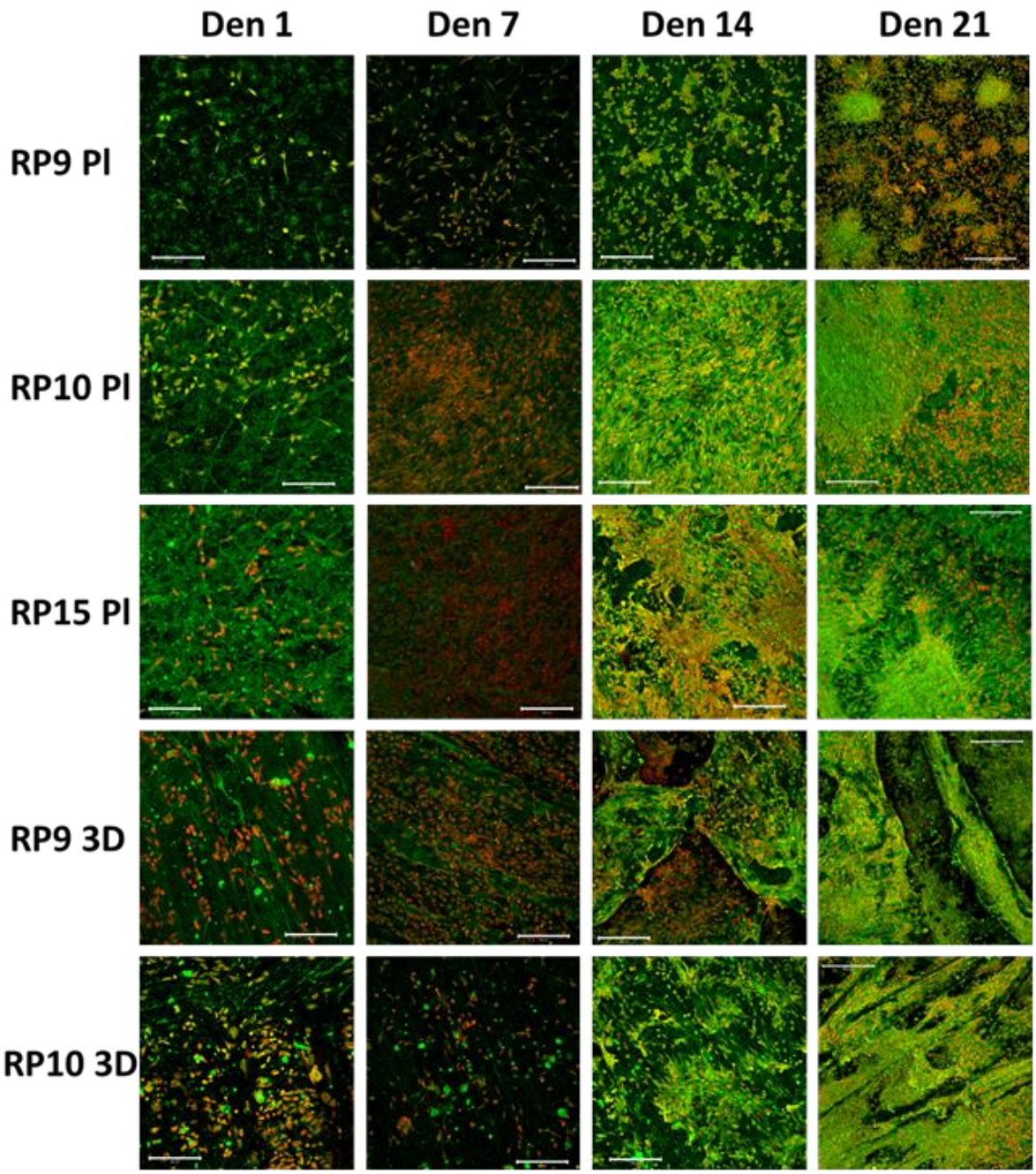
*Obr. 2: Buněčná proliferace měřená pomocí kvantifikace buněčné DNA. Jako kontrola byly použity Saos-2 buňky nasazené na kultivačním plastu (plast). Označení skupin nad sloupci značí statisticky významné rozdíly (p<0.05; *p<0.001).*

2.3 Vizualizace buněk na nosičích pomocí konfokální mikroskopie a hloubková projekce

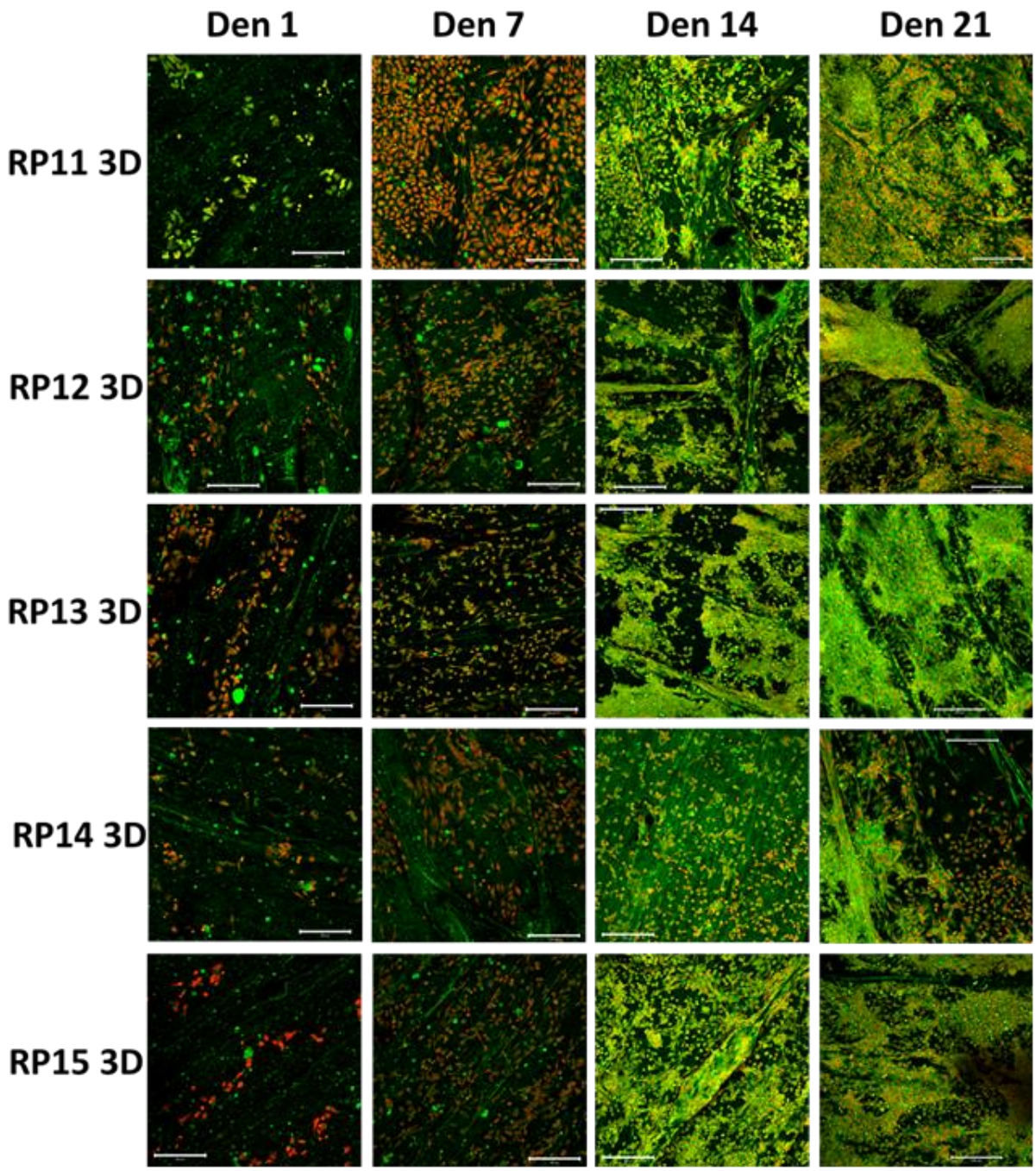
Buněčná distribuce na nosičích byla sledována pomocí konfokální mikroskopie 1., 7., 14. a 21. den (Obr. 3-6, dvě různá zvětšení). Buněčná jádra byla obarvena pomocí propidium jodidu (na obrázku červeně) a intracelulární membrány DiOC6(3) (na obrázku zeleně). Distribuce buněk byla ovlivněna způsobem nasazení buněk, kdy jsou buňky nasazeny v malé kapce kultivačního média, aby adherovaly na nosiče a nedocházelo k jejich odplavení z jeho povrchu. Z tohoto důvodu byla hustota buněk vyšší ve středu nosiče a směrem ke stranám se snižovala. Není tedy možné řídit se obrázky z konfokální mikroskopie, co se týče počtu buněk (k tomu slouží kvantifikace DNA). Nicméně obrázky odráží docela dobře výsledky testu buněčné proliferace. Například u skupiny RP10 3D je patrna plně konfluentní vrstva buněk (buňky pokrývají celý povrch bez mezer), naopak vzorek RP14 3D je buňkami porostlá sice rovnoměrně, ale poměrně řídce.

21. den byla většina vzorků hustě porostlá buňkami. Nejméně buněk bylo pozorováno u skupiny RP9 Pl a RP14 3D. U některých vzorků bylo patrno, že došlo k částečnému odloupnutí vrstvy buněk.

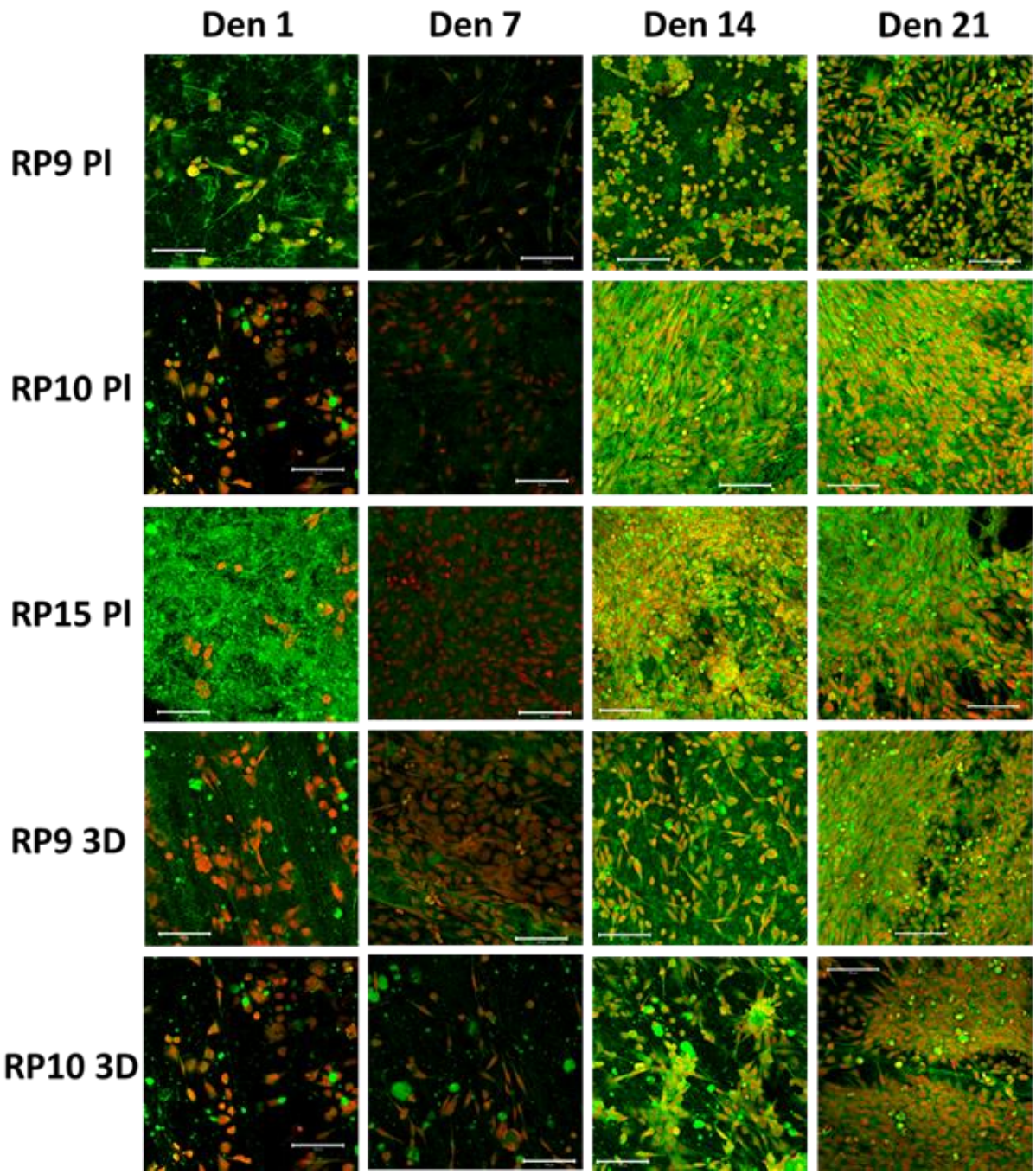
Z obrázků z kanálu propidium jodidu (buněčná jádra), získaných pomocí konfokální mikroskopie, byly následně připraveny hloubkové projekce (Obr. 7-8). Pro tento účel je softwarově určité hloubce z nosiče přiřazena barva na barevné škále. Buňky kopírují strukturu nosiče.



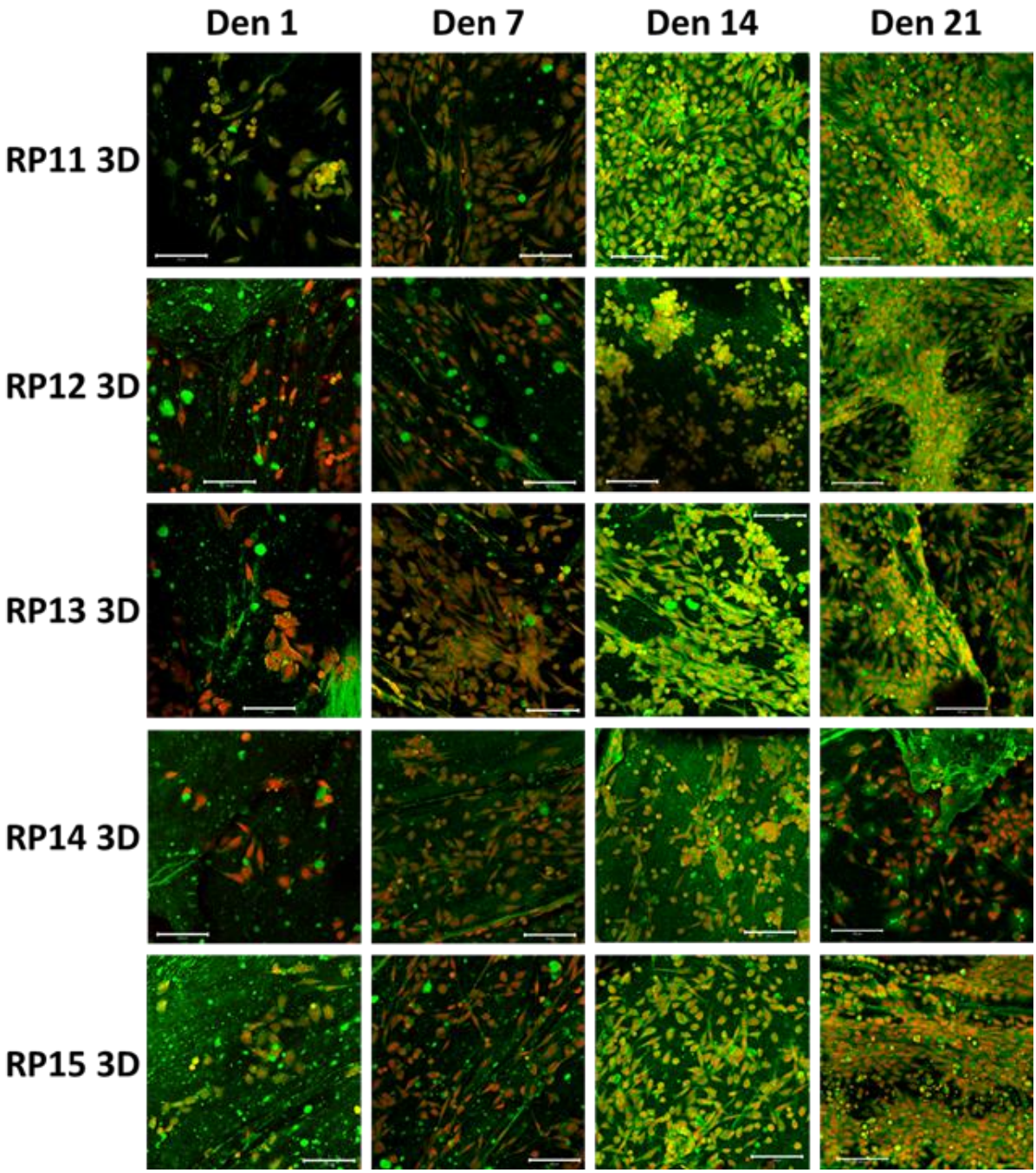
Obr. 3: Buněčná adheze a proliferace na první polovině nosičů v den 1, 7, 14 a 21. Buněčná jádra byla obarvena propidium jodidem (červeně), intracelulární membrány pomocí DiOC6(3) (zeleně), měrka 200 µm.



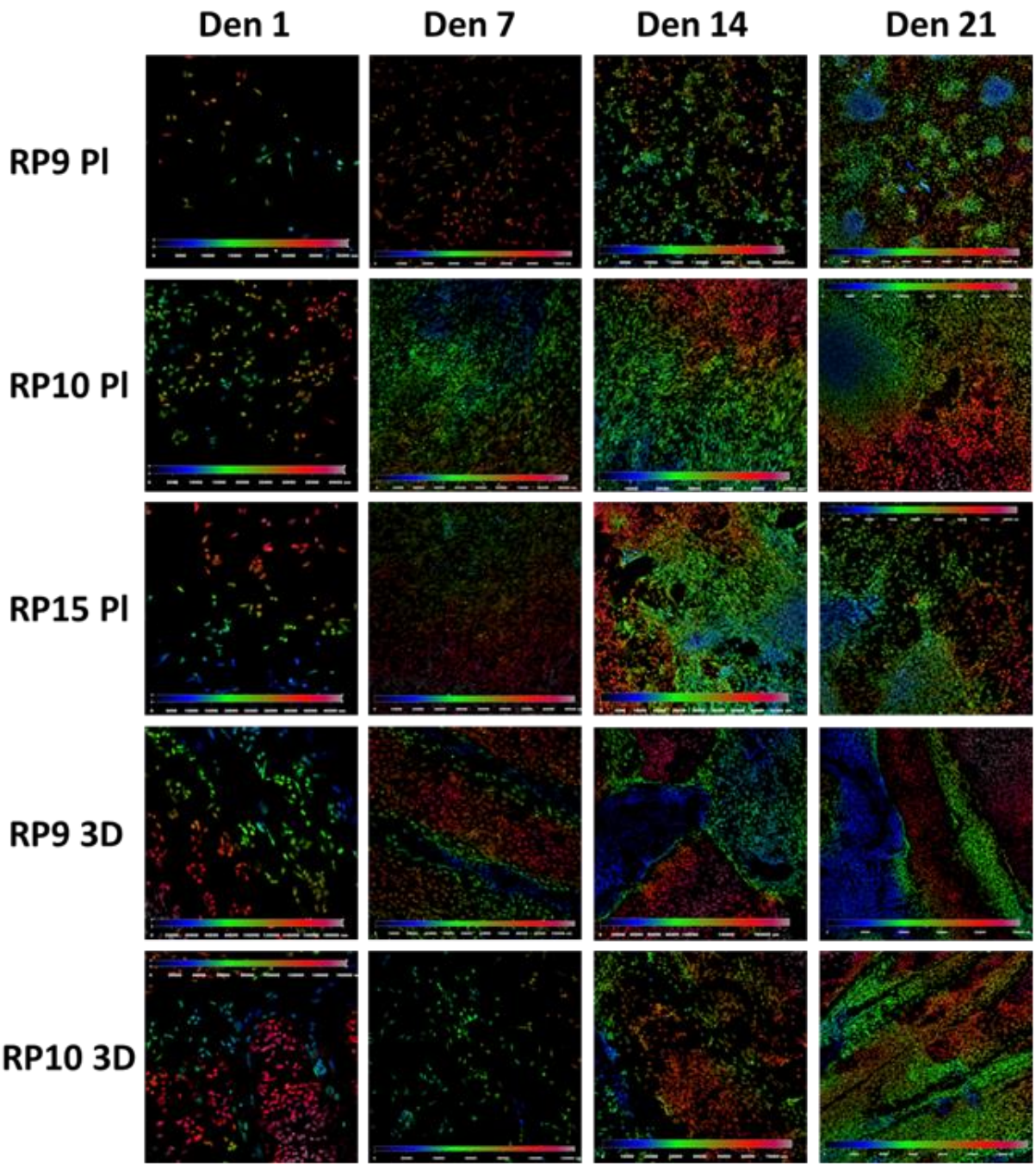
Obr. 4: Buněčná adheze a proliferace na druhé polovině nosičů v den 1, 7, 14 a 21. Buněčná jádra byla obarvena propidium jodidem (červeně), intracelulární membrány pomocí DiOC6(3) (zeleně), měrka 200 µm.



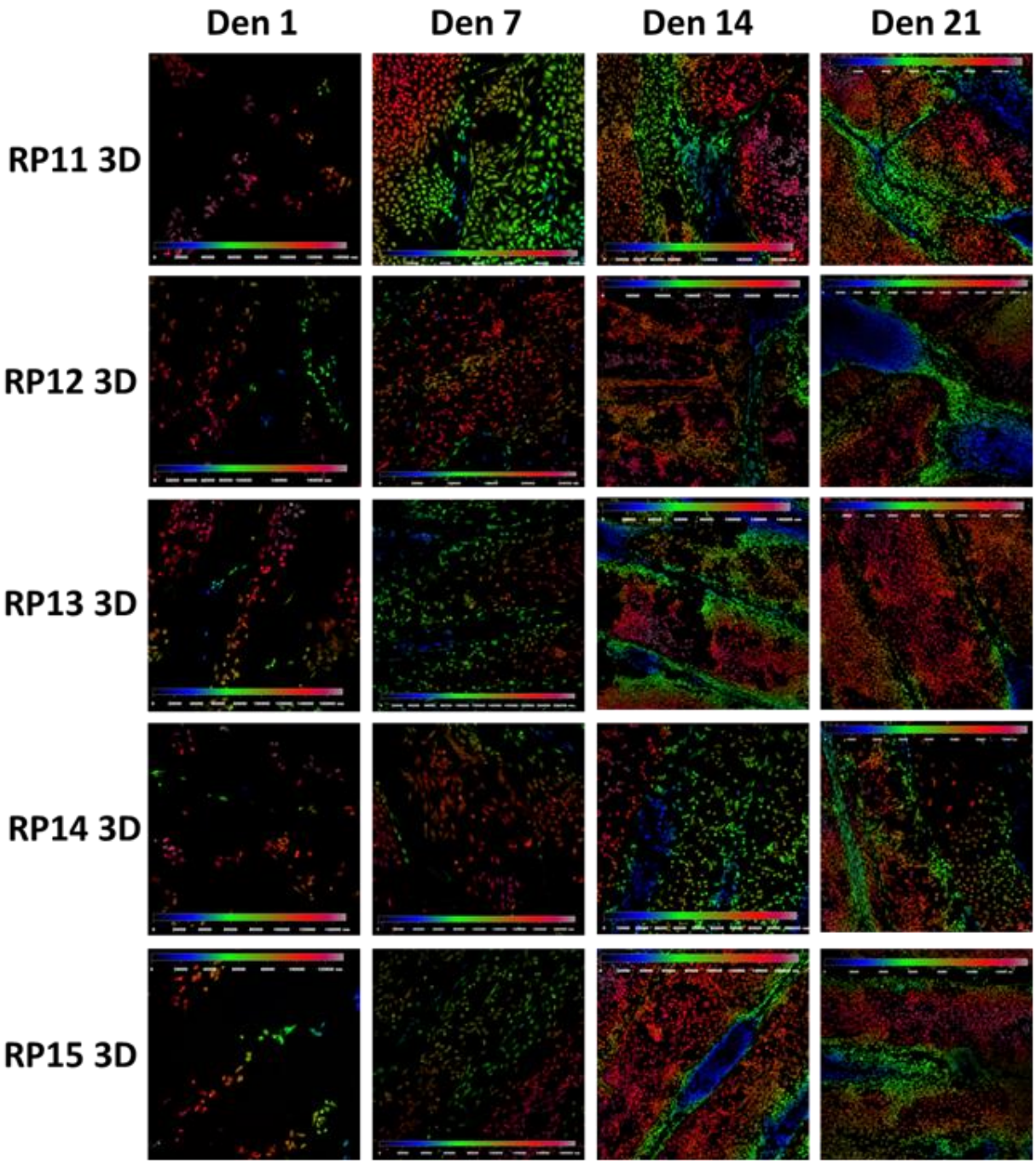
Obr. 5: Buněčná adheze a proliferace na první polovině nosičů v den 1, 7, 14 a 21. Buněčná jádra byla obarvena propidium jodidem (červeně), intracelulární membrány pomocí DiOC6(3) (zeleně), měrka 100 µm.



Obr. 6: Buněčná adheze a proliferace na druhé polovině nosičů v den 1, 7, 14 a 21. Buněčná jádra byla obarvena propidium jodidem (červeně), intracelulární membrány pomocí DiOC6(3) (zeleně), měrka 100 µm.



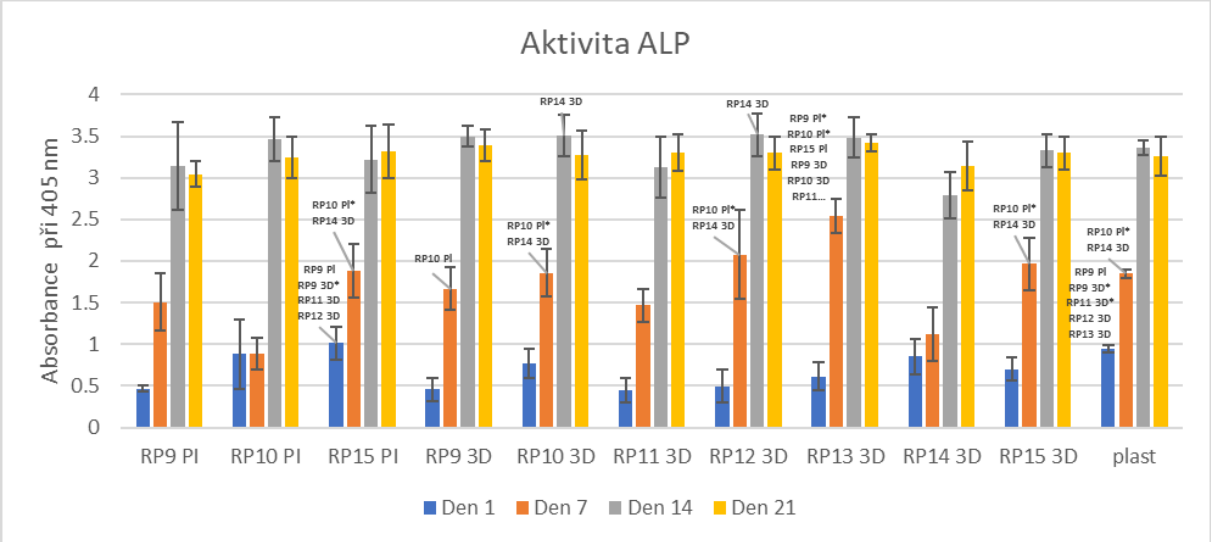
Obr. 7: Hloubkové projekce u první poloviny skupin v den 1, 7, 14 a 21. Buněčná jádra určité barvy se nachází v hloubce odpovídající barvě na barevné škále.



Obr. 8: Hloubkové projekce u druhé poloviny skupin v den 1, 7, 14 a 21. Buněčná jádra určité barvy se nachází v hloubce odpovídající barvě na barevné škále.

2.4 Aktivita ALP

Aktivita ALP byla měřena jako ukazatel osteogenní diferenciace buněk. Nejvyšší aktivita ALP 24 hod po nasazení byla sledována na kultivačním plastu a dále pak u skupiny RP15 Pl. 7. den pak byla nejvyšší hodnota naměřena u RP13 3D, naopak nejnižší u skupiny RP10 Pl a RP14 3D. 14. den experimentu aktivita ALP dále narůstala, nejméně u skupiny RP14 3D. 21. den již nedocházelo k nárůstu aktivity ALP, ta byla vyrovnaná u všech skupin.

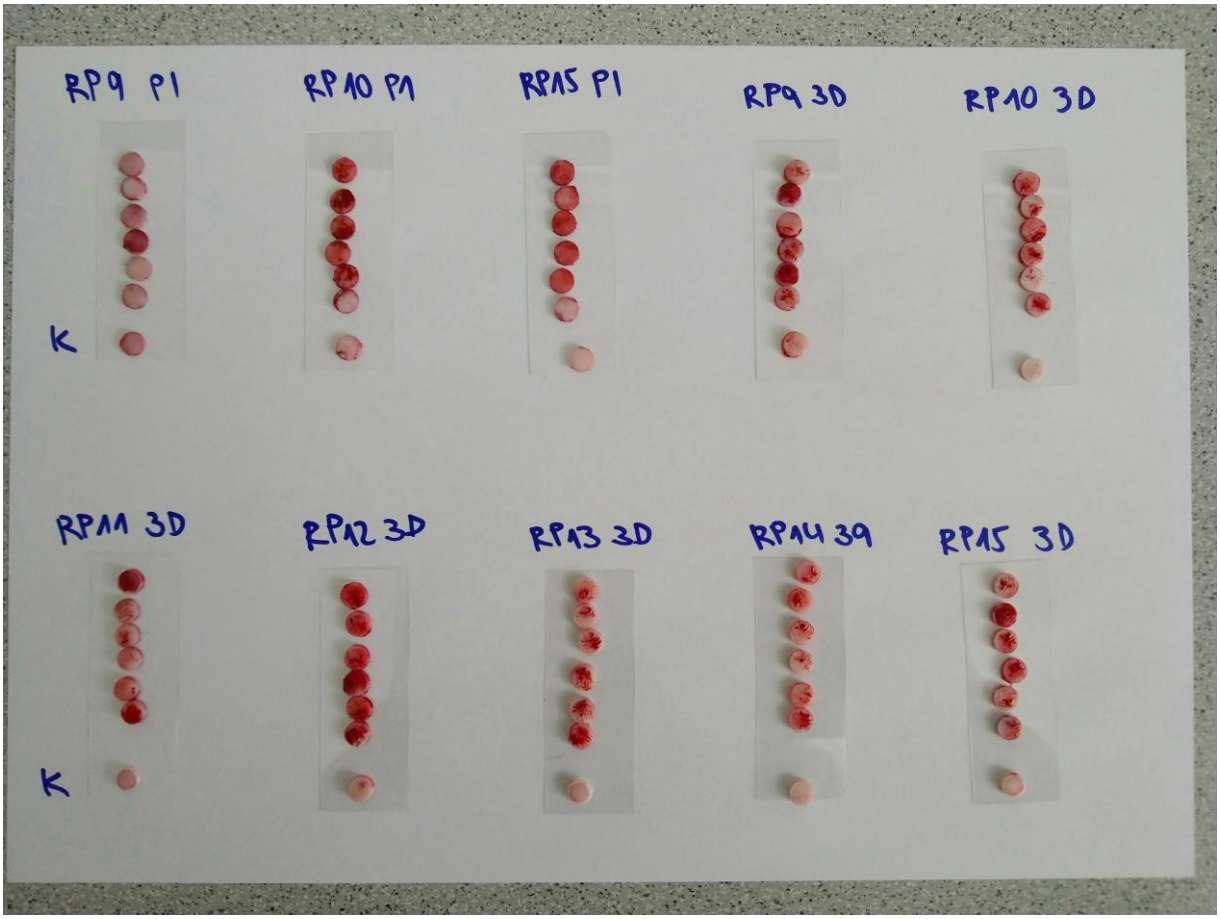


*Obr. 9: Aktivita alkalické fosfatázy byla měřena jako ukazatel osteogenní diferenciace. Jako kontrola byly použity Saos-2 buňky nasazené na kultivačním plastu (plast). Označení skupin nad sloupci značí statisticky významné rozdíly (p<0.05; *p<0.001).*

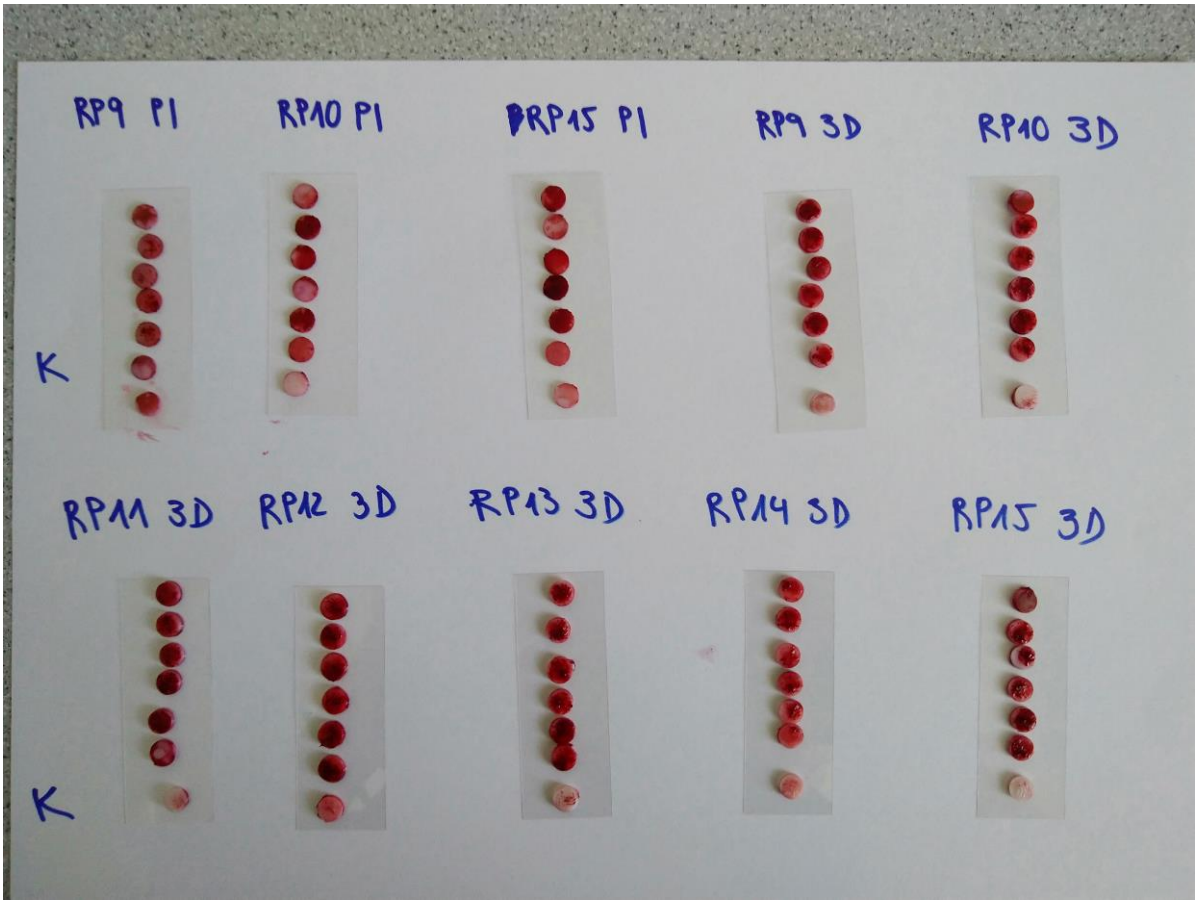
2.5 Mineralizace nosičů

Mineralizace nosičů byla měřena jako důležitý ukazatel osteogenní diferenciace buněk. Mineralizace je na obrázcích vidět jako jasně červená sloučenina. K mineralizaci dochází v pozdní fázi inkubace, mineralizace tedy byla detekována 14. a 21. den. Bylo foceno vždy 6 nosičů, 7. dole byla kontrola, tedy prázdný nosič bez buněk.

Z fotografie (Obr. 10) je patrné, že k největší míře mineralizace docházelo na vzorku RP10 Pl a RP12 3D. Naopak nízkou míru zabarvení sledujeme u skupiny RP9 Pl a RP14 3D. Nicméně je patrna velká variabilita mezi jednotlivými vzorky. 21. den (Obr. 11) docházelo k nárůstu mineralizace, což značí větší míra zabarvení, zejména u skupiny RP10 3D, RP11 3D, RP12 3D, RP13 3D a RP15 3D. Nejmenší mineralizace byla sledována u skupiny RP9 Pl a RP14 3D, což odpovídá menšímu počtu buněk



Obr. 10: Mineralizace na nosičích detekována pomocí Alizarin Red S kitu 14. den kultivace. Červené zbarvení detekuje mineralizaci produkovanou nasazenými Saos2 buňkami. 7. vzorek v pořadí je vždy kontrolní, tedy bez buněk.



Obr. 21: Mineralizace na nosičích detekována pomocí Alizarin Red S kitu 21. den kultivace. Červené zbarvení detekuje mineralizaci produkovanou nasazenými Saos2 buňkami. 7. vzorek v pořadí je vždy kontrolní, tedy bez buněk.

3. Závěr

Z výsledků můžeme uzavřít, že všechny testované nosiče byly biokompatibilní, buňky adherované na nosiče měly dobrou morfologii. Z planárních vzorků byl nejlepší RP10 Pl, kde byla zaznamenána nejvyšší míra proliferace a také mineralizace. Naopak nejhůře na tom byl vzorek RP9 Pl. U 3D tištěných nosičů vyšel nejlépe vzorek RP13 3D a pak RP12 3D. Na těchto nosičích byla sledována nejvyšší metabolická aktivita, proliferace i míra osteogenní diferenciace. Nejhorší 3D tištěný vzorek byl RP14 3D. 21. den již nedocházelo k nárůstu počtu buněk, ani ke zvýšení aktivity ALP. Naopak bylo patrno, že dochází k nárůstu mineralizace.