



1ο Πανελλήνιο Συνέδριο Φυσικών Επιστημών στην Υγεία:
Καινοτομίες και Προοπτικές
22-23 Σεπτεμβρίου 2023

Αύξηση της οστεογενούς διαφοροποίησης σε πιεζοηλεκτρικά ικριώματα με χρήση μηχανικής διέγερσης

Νικολέτα Ναταλία Ταβερναράκη¹, Βαρβάρα Πλατανιά¹, Μαρία Χατζηνικολαΐδου^{1,2}

¹Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Υλικών, Πανεπιστήμιο Κρήτης, 70013 Ηράκλειο, Ελλάδα

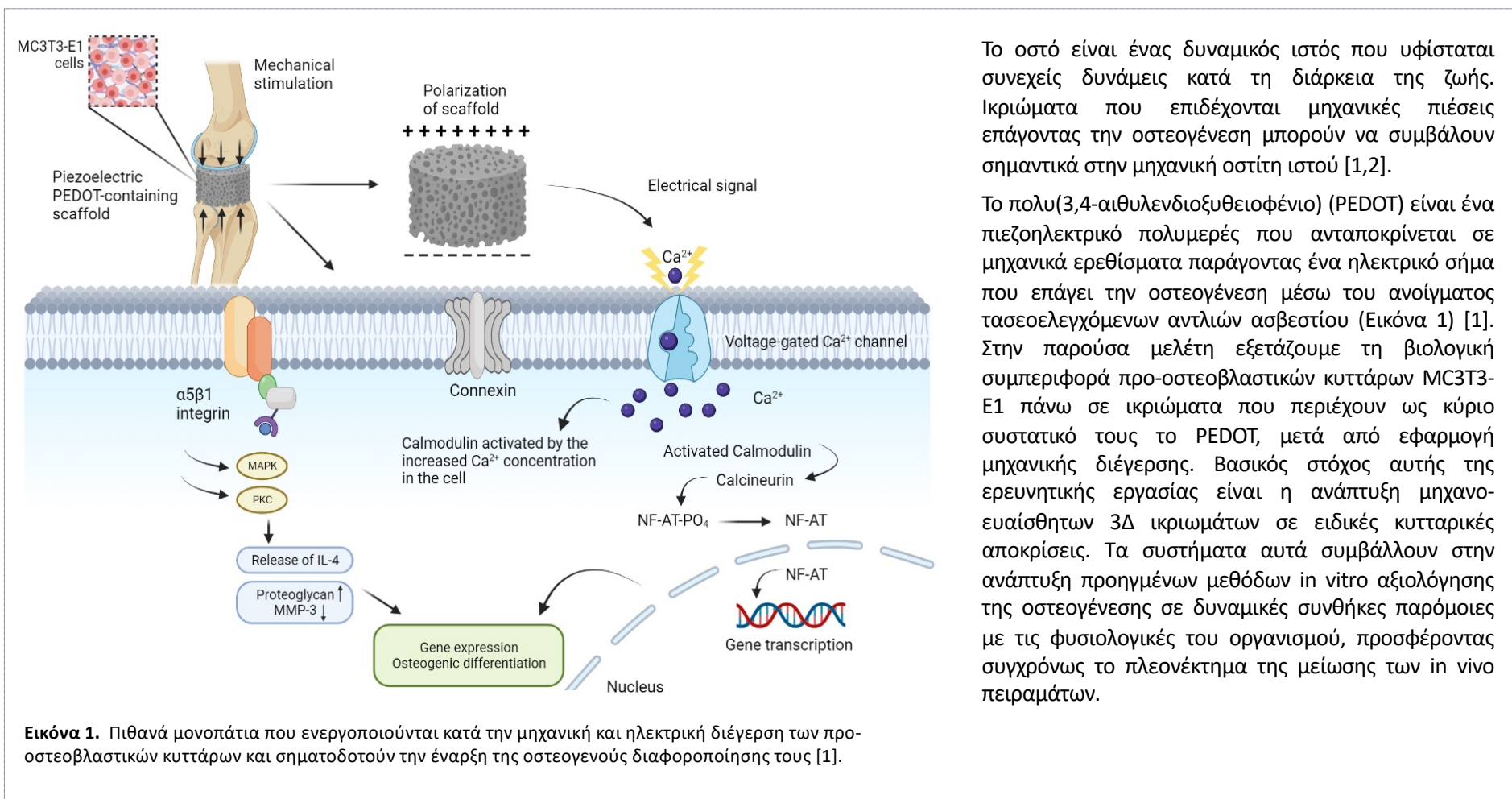
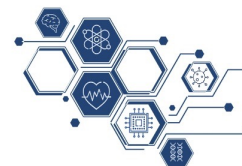
²Ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας (ΙΤΕ)-ΙΗΔΛ, 70013 Ηράκλειο, Ελλάδα



Διοργανωτές



1. Εισαγωγή-Σκοπός

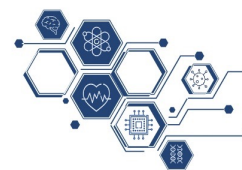


Το οστό είναι ένας δυναμικός ιστός που υφίσταται συνεχείς δυνάμεις κατά τη διάρκεια της ζωής. Ικρίωματα που επιδέχονται μηχανικές πιέσεις επάγοντας την οστεογένεση μπορούν να συμβάλουν σημαντικά στην μηχανική οστική ιστού [1,2].

Το πολυ(3,4-αιθυλενοδιοξυθειοφάνιο) (PEDOT) είναι ένα πιεζοηλεκτρικό πολυμερές που ανταποκρίνεται σε μηχανικά ερεθίσματα παράγοντας ένα ηλεκτρικό σήμα που επάγει την οστεογένεση μέσω του ανοίγματος τάσεοελεγχόμενων αντλιών ασβεστίου (Εικόνα 1) [1]. Στην παρούσα μελέτη εξετάζουμε τη βιολογική συμπεριφορά προ-οστεοβλαστικών κυττάρων MC3T3-E1 πάνω σε ικρίωματα που περιέχουν ως κύριο συστατικό τους το PEDOT, μετά από εφαρμογή μηχανικής διέγερσης. Βασικός στόχος αυτής της ερευνητικής εργασίας είναι η ανάπτυξη μηχανοευαίσθητων 3D ικριωμάτων σε ειδικές κυτταρικές αποκρίσεις. Τα συστήματα αυτά συμβάλλουν στην ανάπτυξη προηγμένων μεθόδων in vitro αξιολόγησης της οστεογένεσης σε δυναμικές συνθήκες παρόμοιες με τις φυσιολογικές του οργανισμού, προσφέροντας συγχρόνως το πλεονέκτημα της μείωσης των in vivo πειραμάτων.

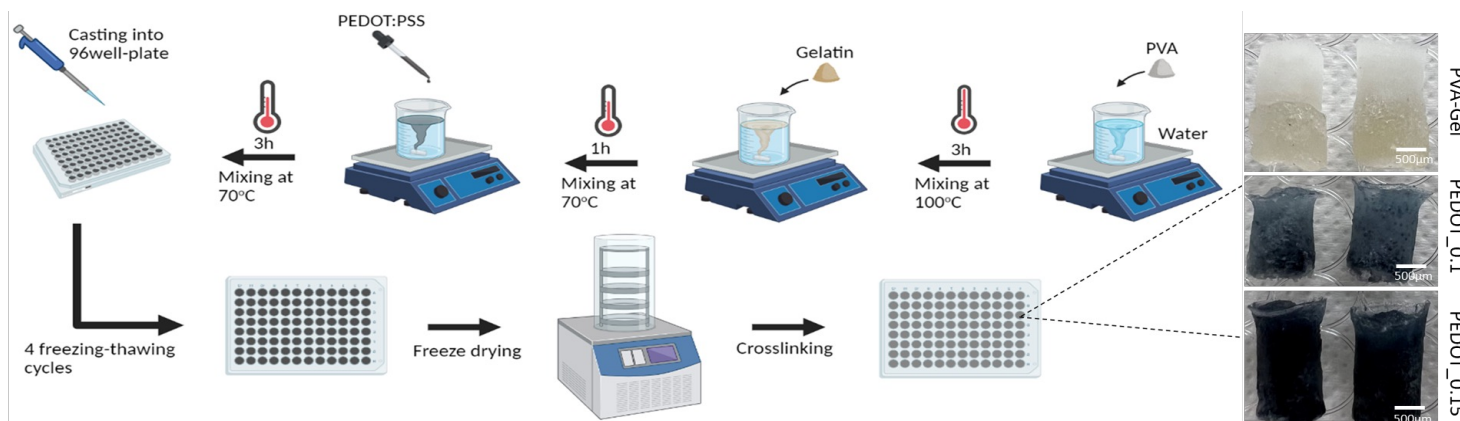
Εικόνα 1. Πιθανά μονοπάτια που ενεργοποιούνται κατά την μηχανική και ηλεκτρική διέγερση των προ-οστεοβλαστικών κυττάρων και σηματοδοτούν την έναρξη της οστεογενούς διαφοροποίησής τους [1].

2. Μέθοδοι και Υλικά



1ο Πανελλήνιο Συνέδριο Φυσικών Επιστημών στην Υγεία:
Καινοτομίες και Προοπτικές
22-23 Σεπτεμβρίου 2023

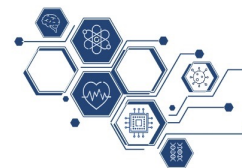
Δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις PEDOT (0.15% κατά βάρος και 0.10% κατά βάρος) ομογενοποιήθηκαν με υδατικό διάλυμα 5% w/v πολυ(βινυλικής αλκοόλης) (PVA) και 5% w/v ζελατίνης (Gelatin) τοποθετήθηκαν σε καλούπια και λυοφιλώθηκαν. Τα μόρια διασταύρωσης (crosslinkers) που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 2% v/v (3-γλυκιδυλοξυπροπυλ) τριμεθοξυσιλάνιο (GOPS) και 0.025% v/v γλουταραλδεΐδη. Μελετήθηκαν επίσης μη σταυρωδεμένα (non-crosslinked) ικρίωματα για όλες τις συνθέσεις καθώς και ικρίωματα απουσία PEDOT ως δείγματα ελέγχου (control).



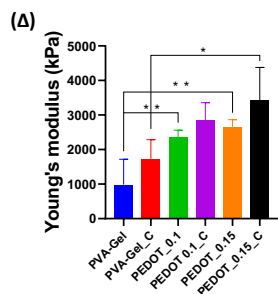
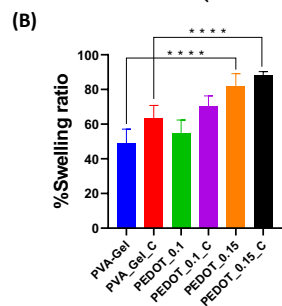
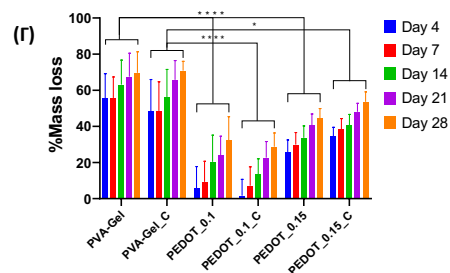
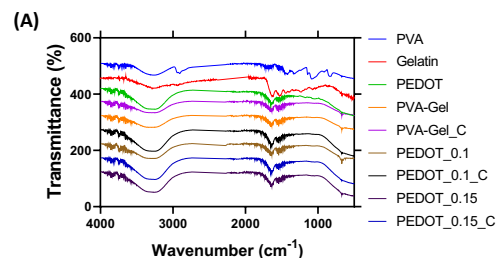
Εικόνα 2. Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας σύνθεσης των ικρίωμάτων. Η κλίμακα αντιπροσωπεύει 500 µm.

Εξετάστηκαν οι φυσικοχημικές ιδιότητες των δειγμάτων όπως η ελαστικότητα, ο ρυθμός αποδόμησης και η απόδοση των διαστευρώσεων μέσω ανάλυσης FTIR. Όλες οι συνθέσεις των ικρίωμάτων χαρακτηρίστηκαν μηχανικά με μέτρηση του μέτρου ελαστικότητας (Young modulus). Μελετήθηκαν η βιωσιμότητα, η μορφολογία και η διαφοροποιητική δυναμική των κυττάρων μέσω δεικτών οστεογένεσης. Εκτιμήθηκαν δείκτες που σχετίζονται με την οστεογένεση, συμπεριλαμβανομένης της αλκαλικής φωσφατάσης (ALP). Η παραγωγή ασβεστίου και κολλαγόνου από τα κύτταρα προσδιορίστηκε με φωτομετρική μέθοδο με χρώση με Ο-κρεζόλ φθαλείνη (CPC) και Sirius red, αντίστοιχα. Η ύπαρξη ασβεστίου και φωσφόρου στην επιφάνεια του ικρίωματος μελετήθηκε μέσω της φασματοσκοπίας διάχυσης ενέργειας (EDS). Το πρωτόκολλο μηχανικής διέγερσης που ακολουθήθηκε είναι βασισμένο σε προηγούμενη μελέτη της ερευνητικής μας ομάδας [3]. Τα ικρίωματα υποβλήθηκαν σε μηχανική διέγερση συχνότητας 1 Hz και παραμόρφωσης 10% για 1 ώρα κάθε δεύτερη ημέρα για 21 ημέρες και τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με αυτά μιας στατικής καλλιέργειας. Οι παράμετροι επιλέχθηκαν με κριτήριο κινήσεις από την φυσιολογική κατάσταση του οργανισμού [4].

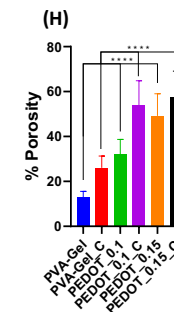
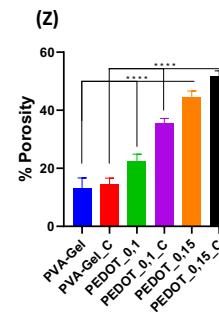
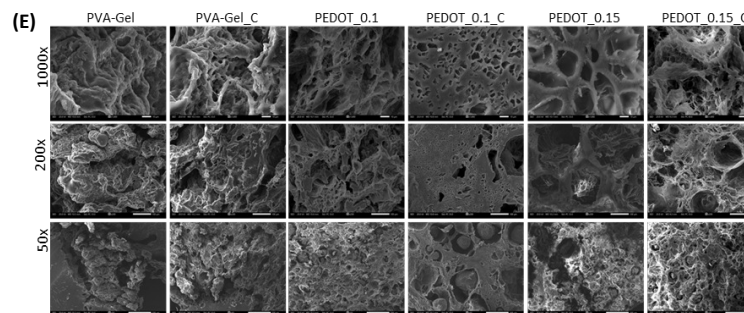
3. Αποτελέσματα



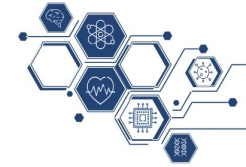
Φυσικοχημικός χαρακτηρισμός



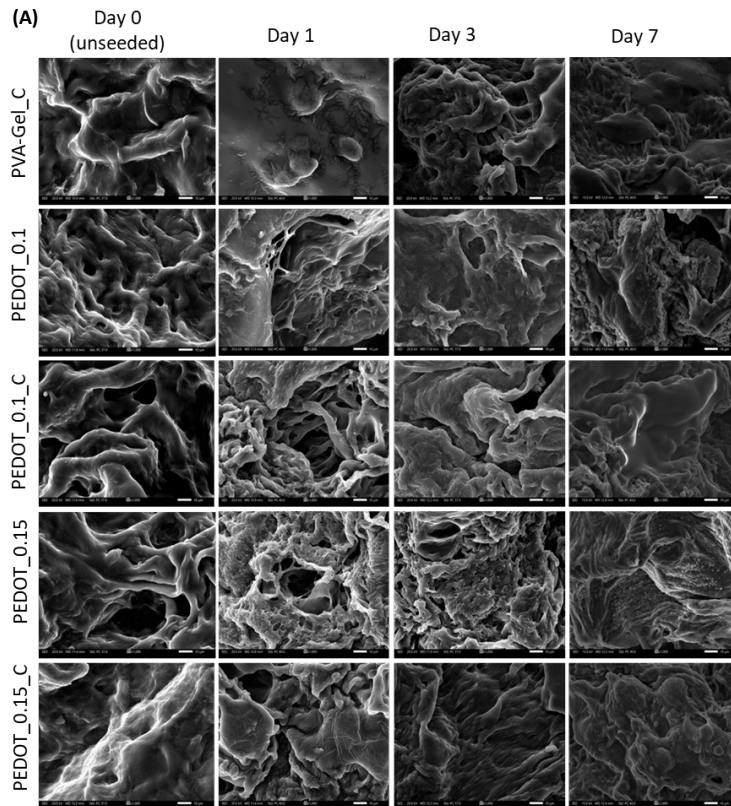
Εικόνα 3. Ανάλυση FTIR για τα διαφορετικής συγκεντρώσεις ικρίωματα και τα βασικά τους συστατικά. 'C' αναφέρεται στα διασταυρωμένα ικρίωματα (A). Ο ρυθμός αποδόμησης εκφρασμένος ως απώλεια μάζας (B), και οι αντίστοιχες τιμές διόγκωσης των λυοφιλιωμένων ικριωμάτων μετά από 3 ώρες εμφύσησης σε νερό (Γ). Η παρουσία του PEDOT οδήγησε στην στατιστικά σημαντική αύξηση της διόγκωσης από 49% σε 87% και την ταυτόχρονη μείωση του ρυθμού αποδόμησης από 75% σε 50%. Αξιολόγηση της ελαστικότητας των ικριωμάτων για εύρος παραμόρφωσης 60-95% και ταχύτητα 15 mm/sec έδειξε μέτρο ελαστικότητας που κυμαίνονταν μεταξύ 1 και 5 MPa, ιδανικές τιμές για εφαρμογές στη μηχανική ιστών (Δ). Το πορώδες όλων των ικριωμάτων παρουσιάζεται μέσω εικόνων SEM (E). Ποσοτικοποίηση του πορώδους έγινε μέσω της μεθόδου μετατόπισης μάζας υγρού (Z) και μέσω επεξεργασίας εικόνων SEM χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα ImageJ (H). Τα διασταυρωμένα ικρίωματα έδειξαν υψηλότερες τιμές πορώδους από τα μη διασταυρωμένα, με εξαίρεση τα ικρίωματα αναφοράς (control) PVA-Gel και PVA-Gel_C, τα οποία παρουσίασαν λιγότερους πόρους και χαμηλότερο πορώδες. Τα PEDOT_0.15_C ικρίωματα παρουσιάζουν τους καλύτερα ορισμένους πόρους. Η κλίμακα αντιπροσωπεύει 100 μm. Η στατιστική ανάλυση δείχνει στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με τα αντίστοιχα ικρίωματα αναφοράς για τους μέσους όρους 7 επαναλήψεων με * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.



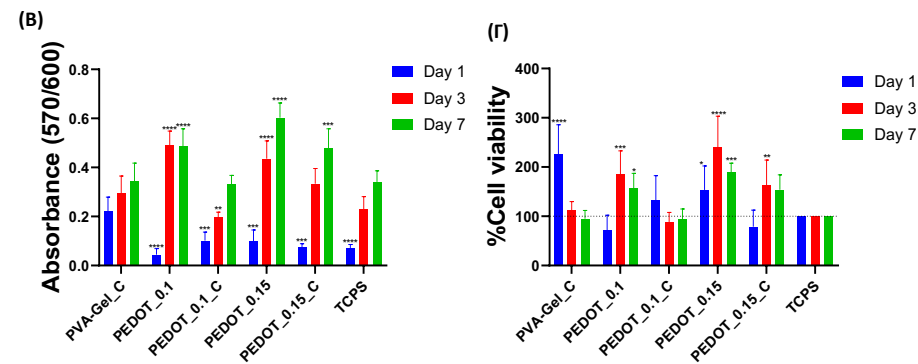
3. Αποτελέσματα



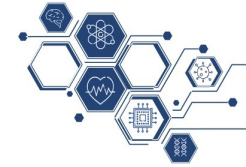
Βιολογικός χαρακτηρισμός



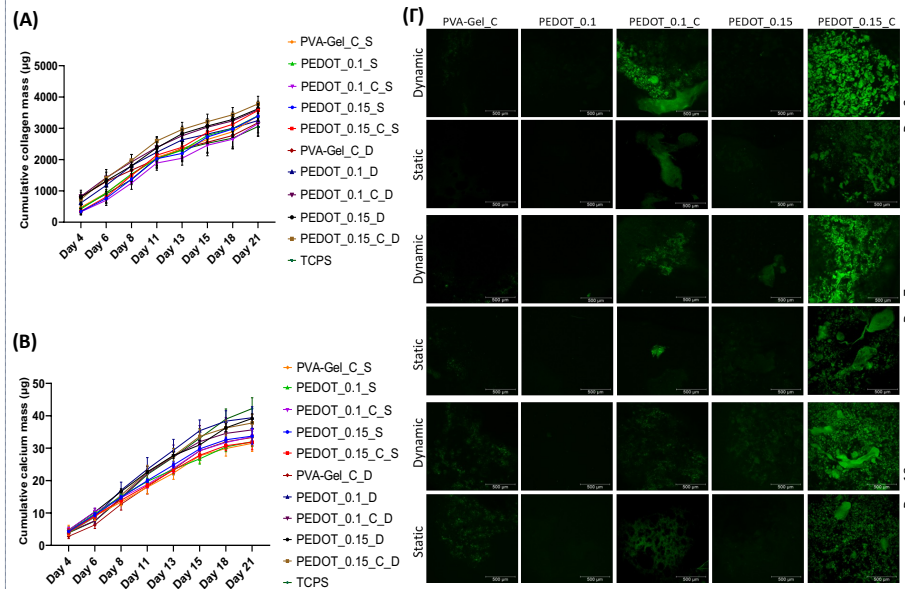
Εικόνα 4. Αντιπροσωπευτικές εικόνες SEM δείχνουν την μορφολογία των προ-οστεοβλαστών πάνω στα ικρίσματα διαφορετικών συστάσεων τις ημέρες 1, 3 και 7 του πειράματος (A). Την ημέρα 3, μεγάλος κυτταρικός αριθμός φαίνεται προσκολλημένος στην επιφάνεια των ικριωμάτων, με εξαίρεση τα ικρίσματα αναφοράς PVA-Gel_C, στα οποία φαίνονται λιγότερα προσκολλημένα κύτταρα. Την ημέρα 7, οι προ-οστεοβλάστες έχουν επικαλύψει πλήρως την επιφάνεια των ικριωμάτων. Η μελέτη κυτταροτοξικότητας για τις ημέρες 1, 3 και 7 του πειράματος είναι εκφρασμένη σε τιμές απορρόφησης (B) και % κυτταρική βιωσιμότητα (Γ). Όλα τα ικρίσματα παρουσίασαν εξαιρετική βιοσυμβατότητα, με καλύτερη εκείνη των PEDOT_0.15 ικριωμάτων. Η κλίμακα αντιπροσωπεύει 10 μm. Κάθε μπάρα αντιπροσωπεύει την μέτρηση 4 επαναλήψεων. (στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με το PVA-Gel_C ικρίωμα αναφοράς (B) και το TCPS (Γ) την αντίστοιχη χρονική στιγμή με * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$).



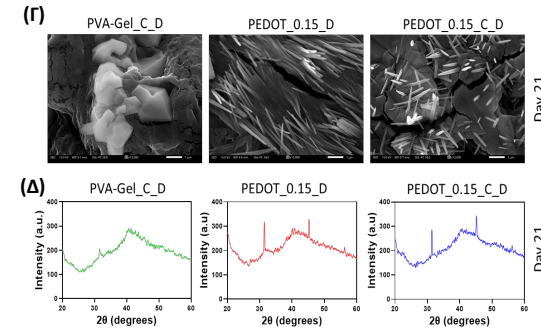
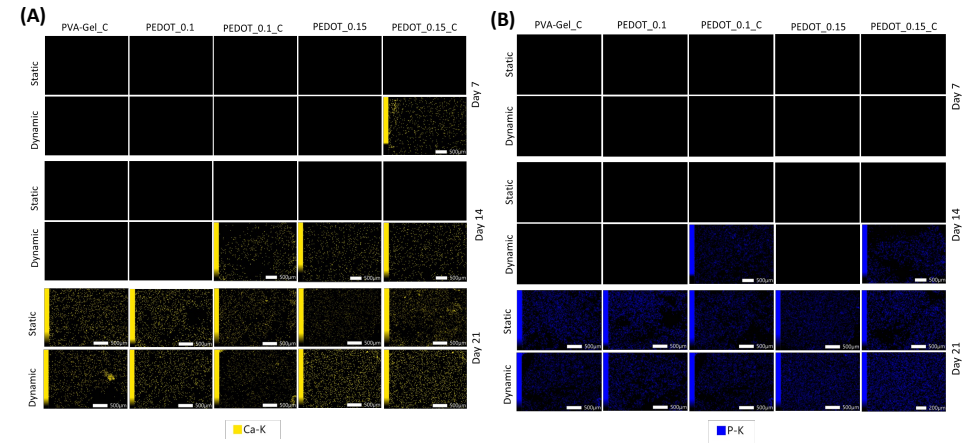
3. Αποτελέσματα



Οστεογενή διαφοροποίηση: Δυναμική και στατική καλλιέργεια

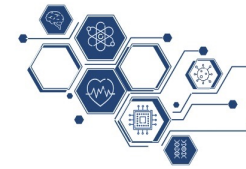


Εικόνα 5. Επίπεδα εκκρινόμενου κολλαγόνου (A) και ασβεστίου (B) μέχρι 21 ημέρες σε καλλιέργεια. Απεικόνιση της δραστικότητας της αλκαλικής φωσφατάσης (πρώιμος δείκτης της οστεογένεσης) μέσω χρώσης ανοσοφθορισμού (πράσινο) και συνεστιακής μικροσκοπίας φθορισμού (Γ). “S” αντιπροσωπεύει την στατική καλλιέργεια ενώ “D” την δυναμική (μέσω μηχανικής διέγερσης).



Εικόνα 6. Προσδιορισμός ασβεστίου και φωσφόρου στην επιφάνεια του ικρίωματος μέσω φασματοσκοπίας διάχυσης ενέργειας (EDS). Το ασβέστιο απεικονίζεται με κίτρινο (A) και ο φώσφορος με μπλε (B). Δημιουργία υδροξυαπατίτη παρατηρήθηκε μέσω SEM (Γ) και ανάλυσης XRD (Δ).

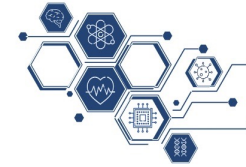
4. Συμπεράσματα



1ο Πανελλήνιο Συνέδριο Φυσικών Επιστημών στην Υγεία:
Καινοτομίες και Προοπτικές
22-23 Σεπτεμβρίου 2023

Τα στοιχεία δείχνουν ότι η ανάπτυξη μηχανικά ευαίσθητων ικριωμάτων συμβάλλει σημαντικά στην αναγέννηση οστίτη ιστού. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης υποδεικνύουν ότι τα ικριώματα που αναπτύξαμε από PEDOT:PSS/PVA/Gelatin υποστηρίζουν την προσκόλληση, τον πολλαπλασιασμό και την οστεογενή διαφοροποίηση των προ-οστεοβλαστών υπό μηχανική διέγερση προσομοιάζοντας την φυσιολογική δυναμική κατάσταση των οστών. Συγκεκριμένα, τα ικριώματα με την σύσταση PEDOT_0.15_C υπό συνθήκες μηχανικής διέγερσης ενίσχυσαν στατιστικά σημαντικά την οστεογενή διαφοροποίηση των κυττάρων, όπως αποδεικνύεται από την ανίχνευση υδροξυαπατίτη στην επιφάνεια των συγκεκριμένων ικριωμάτων μετά από 21 ημέρες. Τα ικριώματα παρουσιάζουν εξαιρετική δυναμική για εφαρμογές στη μηχανική οστίτη ιστού ή άλλων ιστών που φυσιολογικά επιδέχονται μηχανική φόρτιση. Επίσης, η ανάπτυξη ενός ολιστικού μοντέλου τρισδιάστατων τασοελεγχόμενων ικριωμάτων με προ-οστεοβλάστες σε δυναμική καλλιέργεια αποτελεί ένα πρωτοποριακό σύστημα μελέτης και αξιολόγησης της οστεογένεσης σε δυναμικές συνθήκες παρόμοιες με τις φυσιολογικές του οργανισμού. Αυτή η δυνατότητα συμβάλλει και προσδίδει αξία στην εξέλιξη καινοτόμων *in vitro* μεθόδων αξιολόγησης με το σημαντικό πλεονέκτημα της μείωσης των *in vivo* πειραμάτων.

5. Βιβλιογραφία



1ο Πανελλήνιο Συνέδριο Φυσικών Επιστημών στην Υγεία:
Καινοτομίες και Προοπτικές
22-23 Σεπτεμβρίου 2023

1. Guex, A.G., et al., Acta Biomaterialia, 2017
2. Florencio-Silva, R., et al., Biomed Res Int, 2015
3. Kontogianni et al, Bioengineering, 2023
4. Schreivogel, S., et al., Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, 2019