

STUDIO DEL PROCESSO DI MINERALIZZAZIONE DEGLI OSTEOLASTI SU SUPERFICI DI TITANIO DIVERSAMENTE TRATTATE.

In implantologia uno dei materiali più diffusi è il titanio, che viene utilizzato in campo odontoiatrico da più di 40 anni; la biocompatibilità dei materiali da impianto – ai fini di un'adeguata applicazione clinica – è determinata anche dalla morfologia superficiale dei campioni che possono essere trattati in vario modo per limitare il rilascio ionico o per essere resi più o meno rugosi ai fini di un'ottimale osteointegrazione.

La mineralizzazione biologica è principalmente svolta da due tipi di cellule: gli osteoblasti ed i condrociti. Alcuni degli eventi molecolari e cellulari che portano alla mineralizzazione ossea sono noti e sono utilizzati per valutare il comportamento *in vitro* dei suddetti materiali. In particolare è noto che il differenziamento *in vitro* degli osteoblasti è un processo complesso che avviene nell'arco di diverse settimane. Sono stati sviluppati diversi modelli di colture cellulari, sia primarie che linee cellulari, e si ritiene che essi rappresentino ragionevolmente la progressione degli eventi che avvengono *in vivo* con un processo di differenziamento che può essere diviso in tre fasi:

1. Proliferazione
2. Maturazione della matrice
3. Mineralizzazione

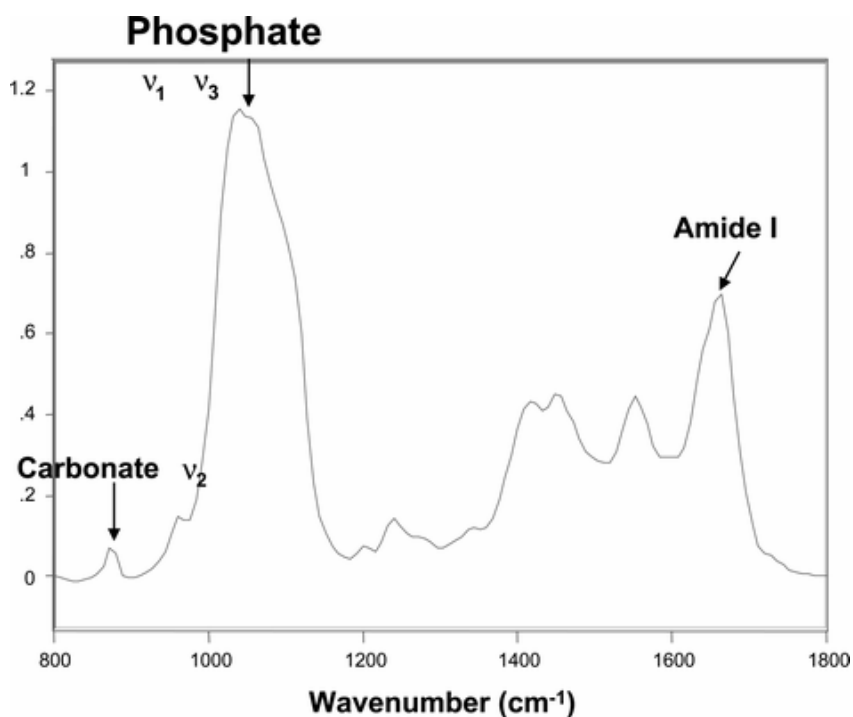
Numerosi geni inclusi la fosfatasi alcalina, il collagene di tipo I, le sialoproteine ossee, l'osteopontina e l'osteocalcina sono espressi durante il differenziamento degli osteoblasti.

Negli esperimenti *in vitro*, quando la fase di proliferazione rallenta, i livelli di attività della fosfatasi alcalina aumentano ed, in presenza di β -glicerofosfato, viene generato fosfato inorganico libero. In questo periodo (che dura 10-12 giorni) la matrice extracellulare subisce una serie di modificazioni nella composizione e nell'organizzazione che la rende pronta per il processo di mineralizzazione durante il quale l'attività della fosfatasi alcalina diminuisce, viene indotto il gene dell'osteopontina e rimane espresso ad alti livelli quello dell'osteocalcina. Al fine di valutare *in vitro* il processo di mineralizzazione è particolarmente indicato l'utilizzo della spettrofotometria infrarossa in

Trasformata di Fourier (FTIR) che permette di valutare la presenza dei segnali relativi ad alcuni gruppi quali:

- FOSFATO (derivato dall'idrossiapatite)
- CARBONATO (derivato dalla sostituzione dei idrossilici e del fosfato nell'idrossiapatite)
- AMMIDE I, II e III (dovuta alle costituenti proteiche nell'osso, soprattutto collagene di tipo I).

Dall'immagine sotto riportata è possibile evidenziare le regioni corrispondenti alle suddette specie



- **FOSFATO:** banda v₁ v₃ del fosfato a 900-1200 cm⁻¹ e la regione v₄ (non evidenziata in questa figura)
- **CARBONATO:** banda v₂ del carbonato a 840 -890 cm⁻¹
- **COLLAGENE:** banda amide I a 1595-1750 cm⁻¹ .

In questo lavoro è stato valutato il processo di differenziamento e di mineralizzazione delle cellule di osteoblasti primari su dischi di titanio con diversa morfologia superficiale.

La messa a punto del protocollo è stata effettuata su

- 1) linea cellulare di osteosarcoma umano MG-63
- 2) osteoblasti di coniglio
- 3) cellule della polpa dentale

MATERIALI E METODI

DISCHI DI TITANIO

Sono stati utilizzati campioni di titanio con diverso trattamento superficiale:

- Dischi C1: superficie liscia
- Dischi C2: superficie rugosa trattata con ossido di alluminio
- Dischi C3: superficie rugosa trattata con ossido di alluminio e sottoposta a plasma a freddo con gas Argon
- Dischi C4: superficie trattata con ossido di zirconio.

CELLULE UTILIZZATE

Sono state utilizzate *a)* cellule di osteosarcoma umano MG-63, *b)* colture primarie di fibroblasti pulpari e di osteoblasti umani da terzi molari inferiori in inclusione ossea totale e *c)* colture primarie di osteoblasti di coniglio prelevati da biopsie di tessuto effettuate sull'animale. Il tessuto osseo prelevato è stato tagliato in piccoli pezzi, messo in coltura in piastre Petri, e le cellule – isolate attraverso il processo della diffusione – sono state coltivate fino a quando non hanno raggiunto la confluenza e quindi distaccate con tripsina per essere utilizzate negli esperimenti.

TERRENO DI COLTURA

Mantenimento in linea delle colture cellulari: le cellule sono state mantenute in linea con DMEM (Gibco BRL) con 10% v/v di siero bovino fetale (FBS inattivato a 53° C, Gibco BRL), l-glutamina (4mM, Gibco BRL), penicillina – streptomina (10,000 U/mL - 10000 µg/mL, Gibco BRL) e Fungizone 1 % v/v (Gibco BRL).

Terreno di mineralizzazione: per le prove di differenziamento, le cellule sono state coltivate in un mezzo osteogenico consistente nel terreno di coltura sopra descritto a cui sono state aggiunti β -glicerofosfato (sale disodico, 10 nM, Sigma-Aldrich) ed acido L-ascorbico 2-fosfato (100 µmol/L, Sigma)

TEST DI DIFFERENZIAMENTO.

Le cellule sono state trattate con tripsina e poste in una piastra Petri contenente 30 dischi di titanio con diverso trattamento di superficie. Le cellule sono state analizzate dopo rispettivamente 7, 14, 21, 28 e 35 giorni.

LATTICO DEIDROGENASI (LDH)

Questo enzima è stato dosato per misurare la mortalità cellulare secondo le istruzioni del kit Roche Diagnostics.

COLLAGENE

Il metodo colorimetrico del Rosso Sirio è stato utilizzato per la valutazione della produzione del collagene di tipo I. I dischi di titanio sono stati lavati con acqua distillata ed incubati con una soluzione di Rosso Sirio 0,1% saturata con acido picrico per 90 minuti. Successivamente i dischi sono stati lavati 2 volte con HCl 0,01 N per 1 minuto e poi immersi in acqua distillata. Dopo il trattamento con etanolo al 70% per 30 secondi, le soluzioni sono state analizzate con uno spettrofotometro ad una lunghezza di 540 nm.

ATTIVITA' DELLA FOSFATASI ALCALINA

Le cellule sono state lisate in Triniton X 10 (250 mL) contenente buffer HCL ed omogeneizzate con due cicli di congelamento e scongelamento. 50 µL di campione sono stati aggiunti a 50 µL di sodio para-nitrofenilfosfato in un tampone di glicina (pH 10.3) ed incubate (37° C, 30 minuti) su una piastra in movimento. Sono stati infine aggiunti 50 µL di NaOH (1 mmol/L). L'assorbanza è stata misurata con uno spettrofotometro a 405 nm per il calcolo dell'attività enzimatica. La quantità totale delle proteine è stata valutata con il metodo di Lowry con determinazione spettrofotometrica a 595 nm e calcolata secondo gli standards di γ -globuline. L'attività della fosfatasi alcalina è stata rapportata alla concentrazione proteica.

OSTEOCALCINA

L'osteocalcina è stata determinata con un test immuno-enzimatico analizzando il campione alla lunghezza d'onda di 450 nm (rat osteocalcin EIA kit BT 490, Biomedical Technologies, Inc) secondo le istruzioni del produttore.

MINERALIZZAZIONE DELLA MATRICE EXTRACELLULARE

Per la valutazione della qualità di matrice extracellulare prodotta è stata adottata la tecnica FTIR. In breve le colture cellulari sono state lavate, lisate e raccolte in una soluzione Triton X100 contenente tris HCl (250 μ L). Dopo la centrifugazione (9000 rpm, 3 min) il sovrinatante è stato rimosso ed il pellet cellulare è stato seccato per ottenere successivamente delle pasticche con KBr. Gli spettri FTIR dei campioni sono stati quindi registrati nell'intervallo 400 - 4000 cm^{-1} con una risoluzione di 1 cm^{-1} . Gli spettri sono stati paragonati con quelli ottenuti da standards di collagene (Sigma-Aldrich) e di fosfato di calcio.

CALCIO E FOSFATO

Sono state seguite le istruzioni dei kit ROCHE DIAGNOSTICS utilizzati per il dosaggio.

RISULTATI

Osteoblasti:

LDH: La mortalità cellulare è moderata in tutte le condizioni sperimentali (Fig. 1); tali risultati sono confermati anche dall'analisi della concentrazione proteica.

Calcio: I risultati ottenuti evidenziano una non corretta mineralizzazione (Fig. 2): la concentrazione di Calcio dovrebbe infatti aumentare nel tempo, mentre in nessuna delle condizioni sperimentali adottate si osserva un tale andamento.

Fosfato: La deposizione del fosfato (sia totale che intracellulare) è regolare nei dischi di tipo C1 e C3 mentre è alterata nei dischi di tipo C2 e C4 (Figg. 3 e 7).

Fosfatasi alcalina: L'andamento dell'attività enzimatica è conforme a quello atteso in tutte le condizioni sperimentali tranne che sulla superficie dei dischi di tipo C4 (Fig. 4).

Collagene: l'andamento della concentrazione di questa proteina, valutata con metodo colorimetrico, è conforme a quello atteso in tutte le condizioni sperimentali tranne che sulla superficie dei dischi di tipo C2 (Fig. 5). I risultati sono confermati anche dai dati della spettrofotometria nell'infrarosso (Fig.6).

Osteocalcina: L'espressione di questa proteina risulta compatibile con una corretta mineralizzazione in tutte le condizioni utilizzate (fig. 8)

Linea cellulare MG-63:

In via preliminare sono state eseguite prove con osteoblasti e MG-63 su tutte le superfici per verificare la validità di alcuni dei saggi utilizzati (proliferazione, mineralizzazione e dosaggio della fosfatasi alcalina), i risultati di queste prove sono riportati nell'allegato "figure preliminari".

Il lavoro di messa a punto delle condizioni sperimentali e delle modalità operative di tutti i saggi effettuati, è proseguito con l'utilizzo della sola linea cellulare umana di osteosarcoma MG-63 e solo sui campioni di titanio con superfici di tipo C1 e C3, utilizzando come controllo le cellule cresciute sulla plastica. Tale scelta operativa è stata dettata sia considerando costo e complessità delle metodiche utilizzate, sia considerando che questa era una parte preliminare allo principale realizzato con le colture primarie di osteoblasti umani.

Proliferazione: le cellule cresciute sulla superficie dei dischi di tipo C1 hanno una minore velocità di proliferazione anche se in 21° giornata non si rileva nessuna differenze tra le cellule cresciute sui tre tipi di substrato (Fig. 1a)

Fosfato: La deposizione del fosfato è regolare solo sulla superficie dei dischi di tipo C1 (Fig. 2a).

Fosfatasi alcalina: L'andamento dell'attività enzimatica nelle cellule esaminate è conforme a quello atteso in tutte le condizioni sperimentali anche se tale attività è migliore nelle MG 63 cresciute sui dischi di tipo C1 (Fig. 3a).

Osteocalcina: L'andamento è anomalo in tutte le condizioni (fig. 4a)

Mineralizzazione: Questo saggio è stato eseguito utilizzando la spettrofotometria FTIR, per la messa a punto della metodica con la linea cellulare MG 63 (Fig. 5a), con osteoblasti di coniglio (Fig. 6a) e con fibroblasti pulpari (Fig.7a).

CONCLUSIONI

Dai risultati ottenuti *in vitro* si evince che i diversi trattamenti superficiali dei campioni di titanio forniti sono in grado di supportare il differenziamento degli osteoblasti umani. Tale caratteristica appare più marcata per i campioni C1 e C3, in quanto tutti i parametri analizzati hanno un andamento perfettamente congruente con quelli riportati in letteratura.

Ovviamente le interazioni tra cellule e materiali da impianto sono molto complesse e possono essere solo parzialmente comprese utilizzando i saggi *in vitro*; per questi motivi non è possibile trasporre direttamente i dati sperimentali ottenuti alla realtà clinica e quindi predire se il fenomeno sopra descritto possa ripetersi anche *in vivo*.

Prof. Claudio Chimenti

Proliferazione MG-63

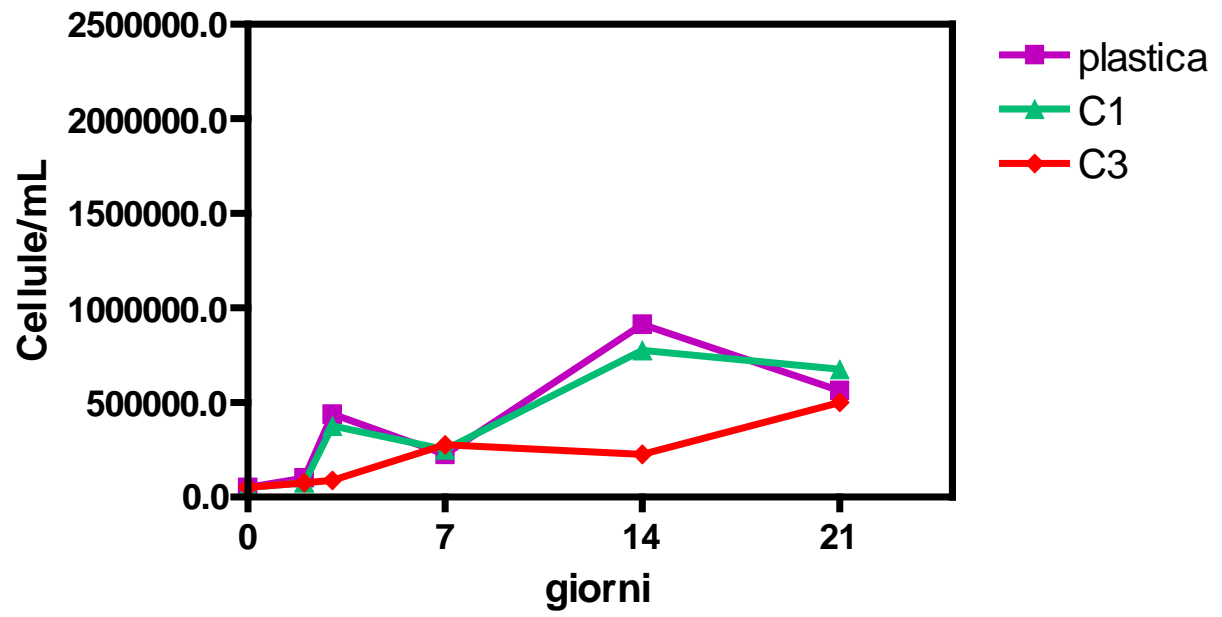


Fig. 1a

Fosfatasi Alcalina in MG-63

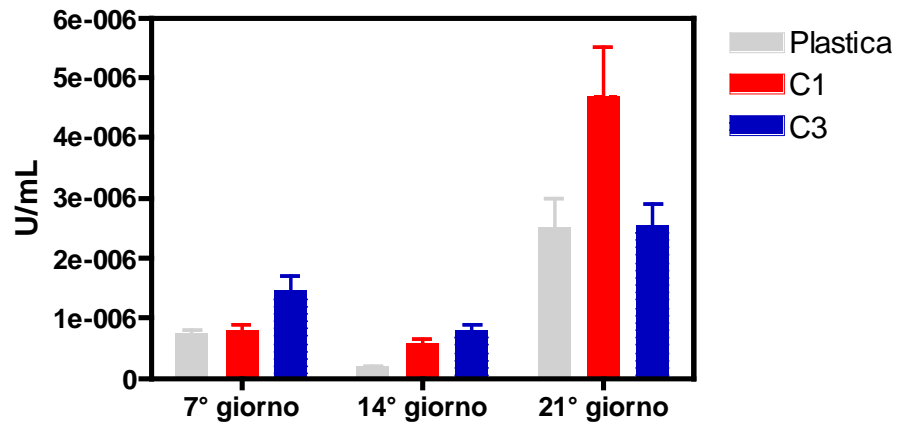


Fig. 2a

Mineralizzazione in MG-63

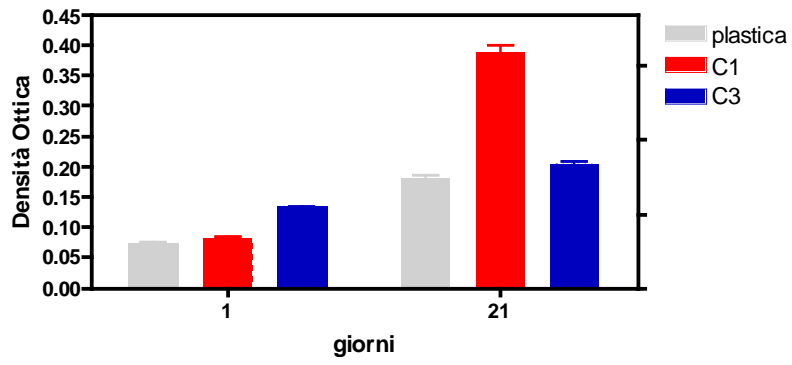


Fig. 3a

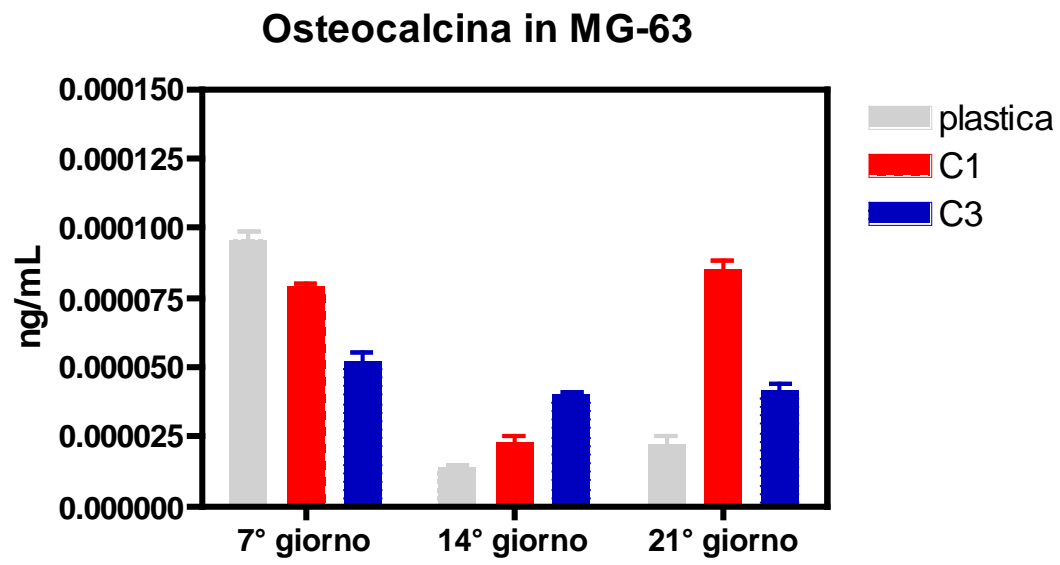


Fig. 4a

MG 63

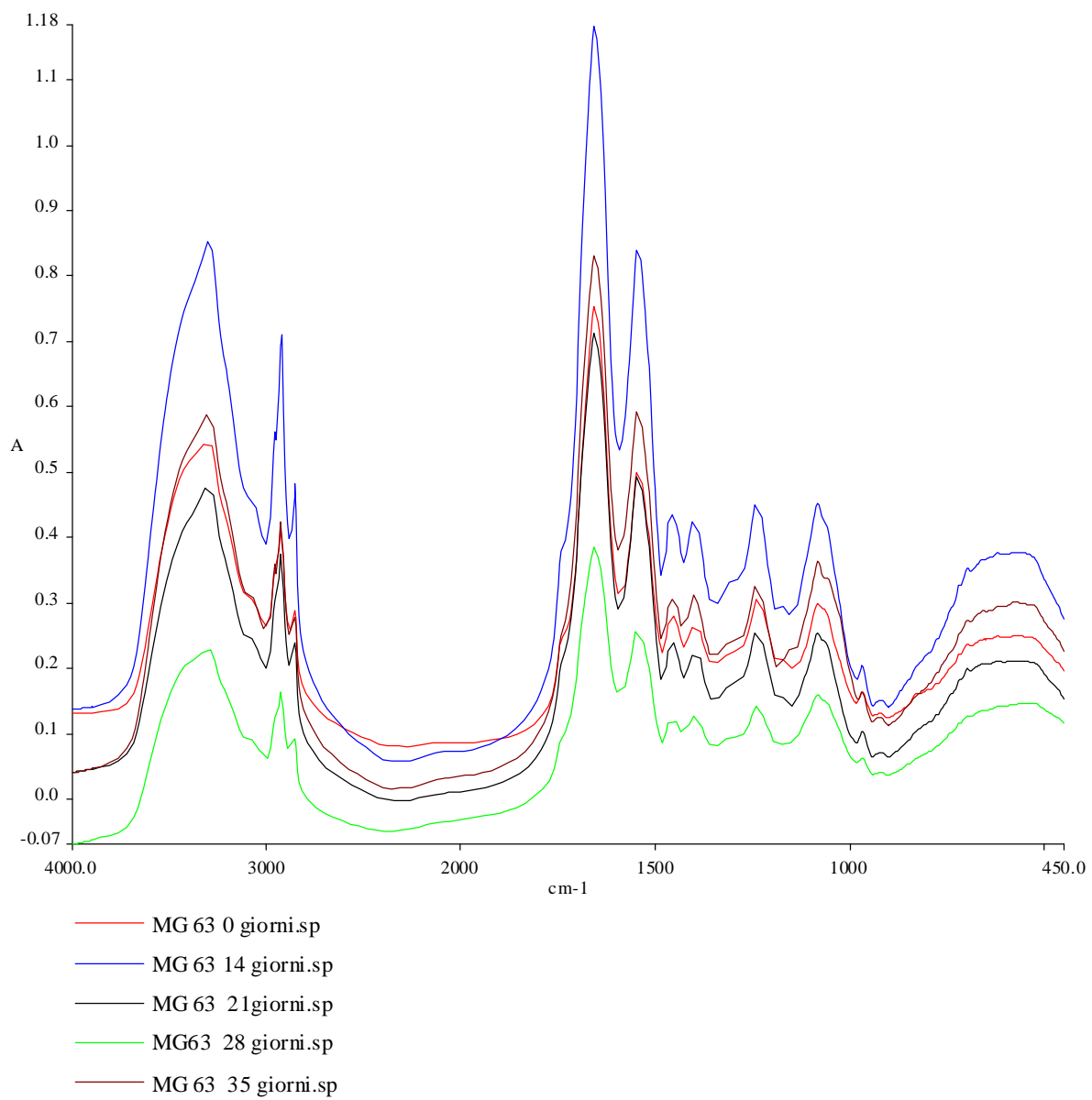


Fig.5a

OSTEOBLASTI CONIGLIO

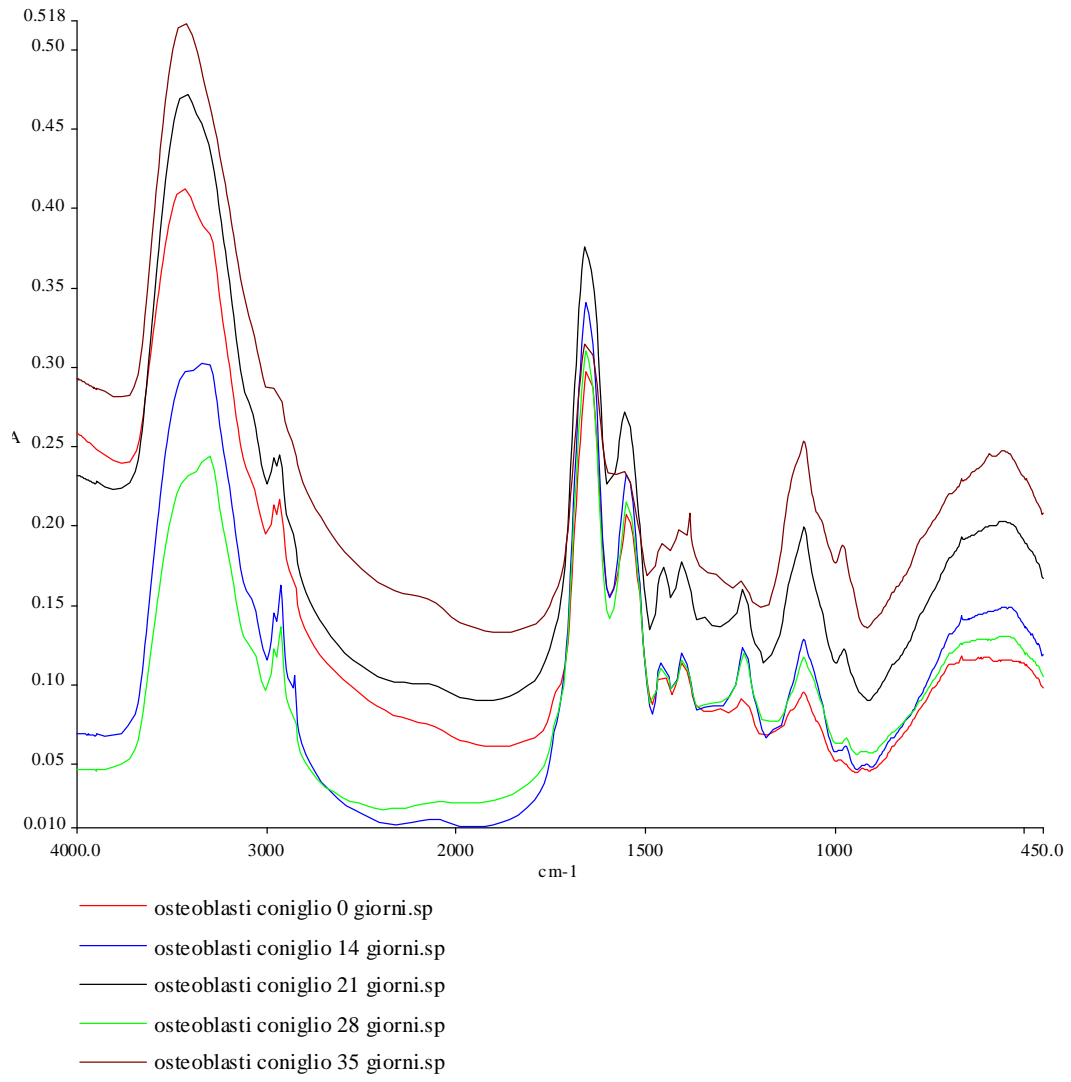


Fig.6a

FIBROBLASTI PULPARI

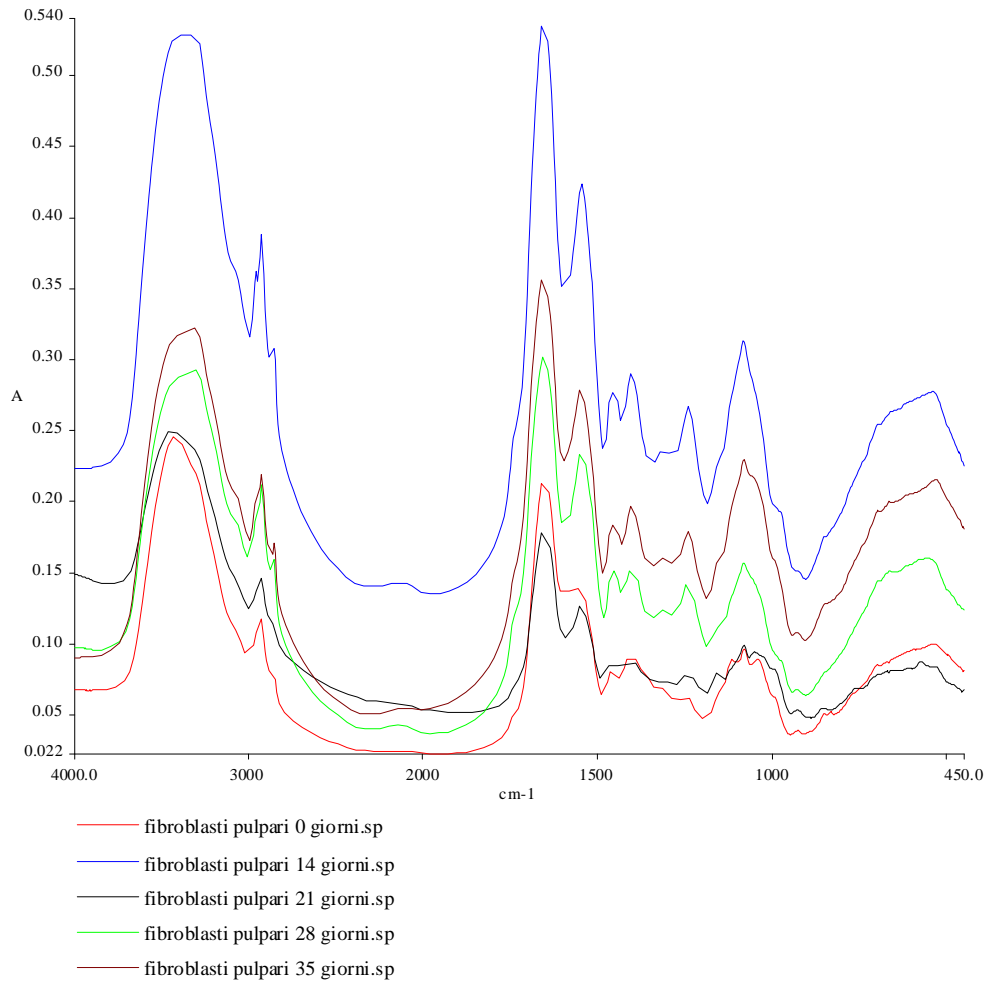


Fig.7a

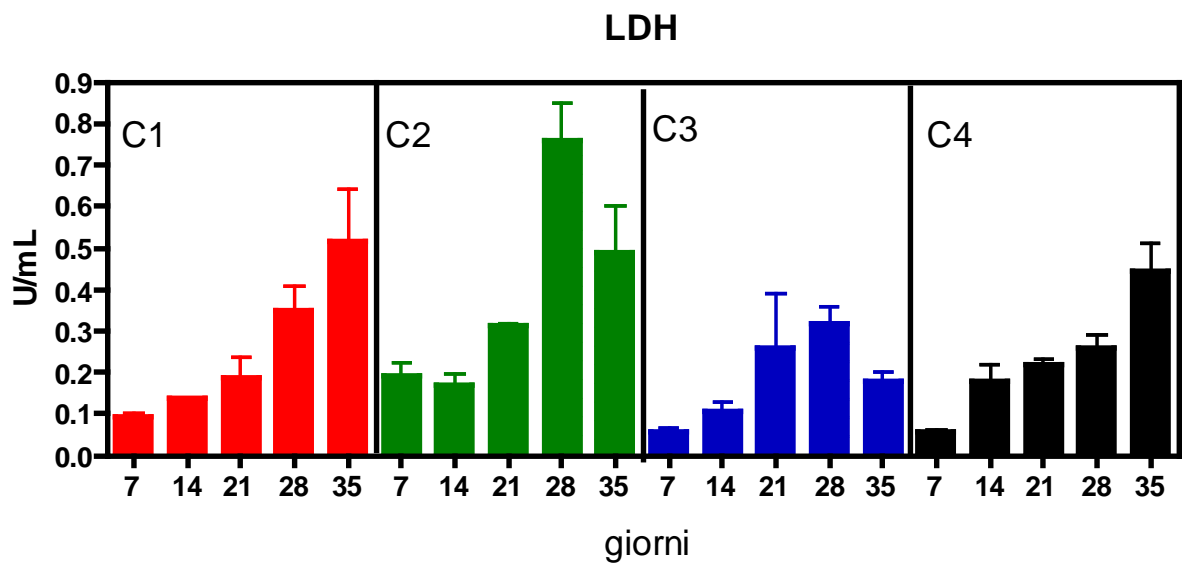


FIG.1

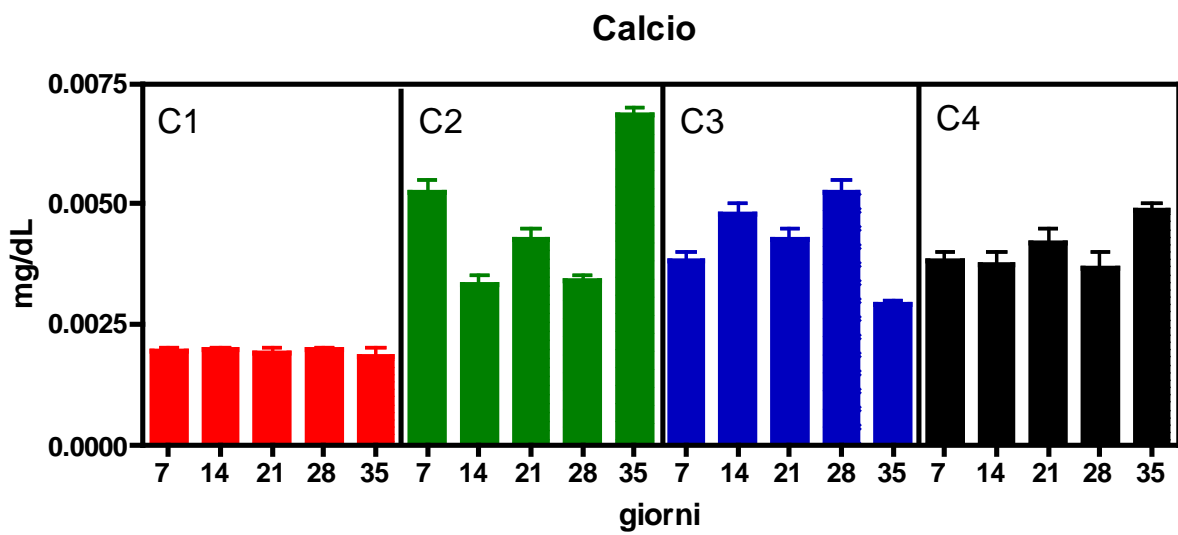


Fig. 2

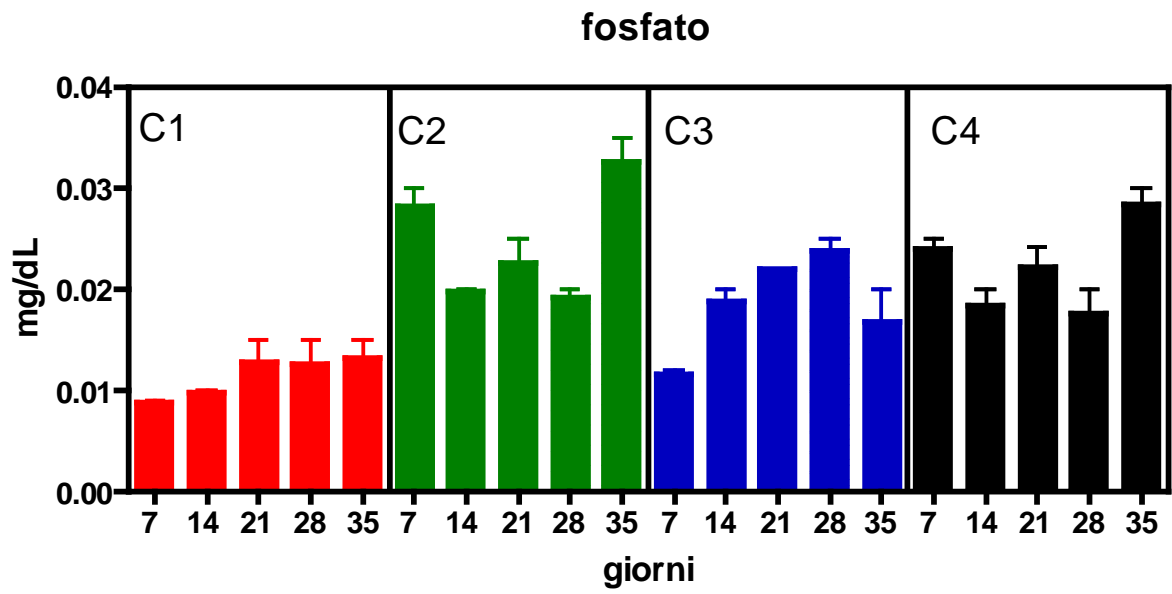


Fig. 3

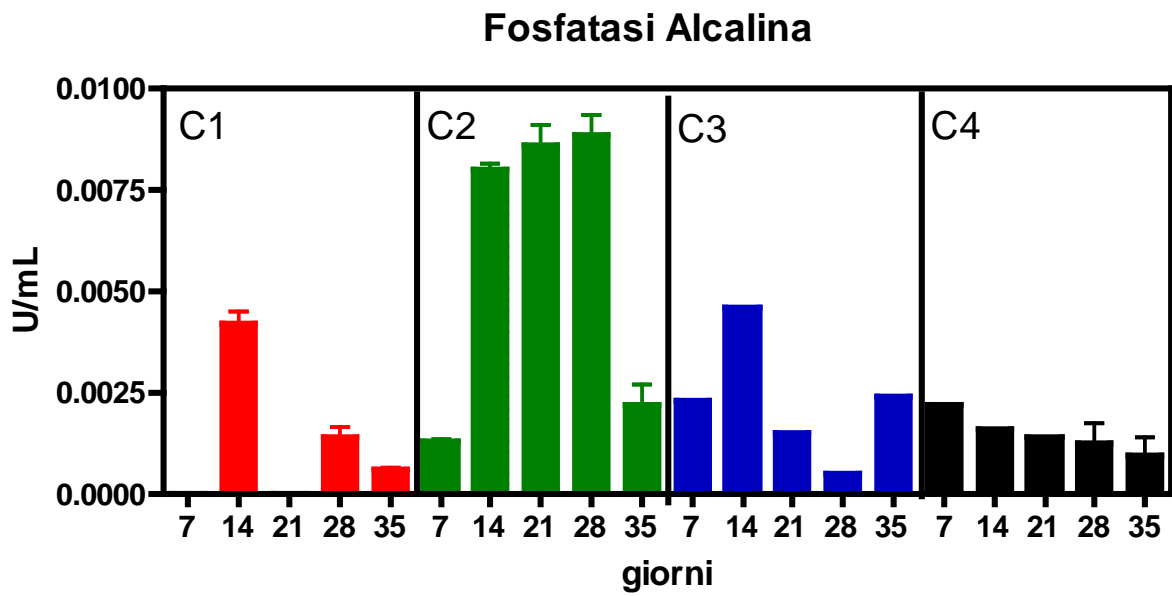


Fig. 4

Collagene

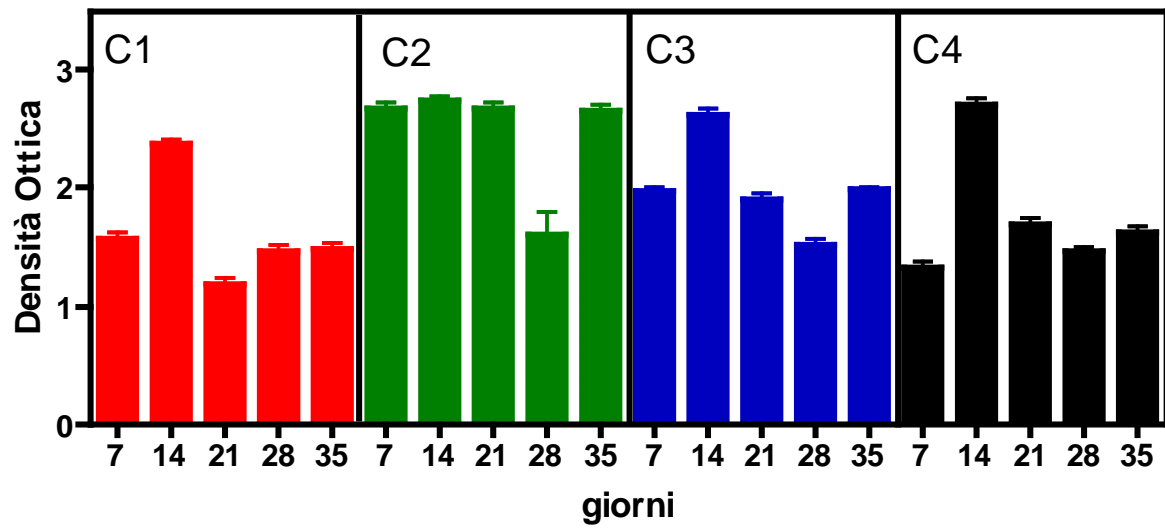


Fig. 5

COLLAGENE (FTIR)

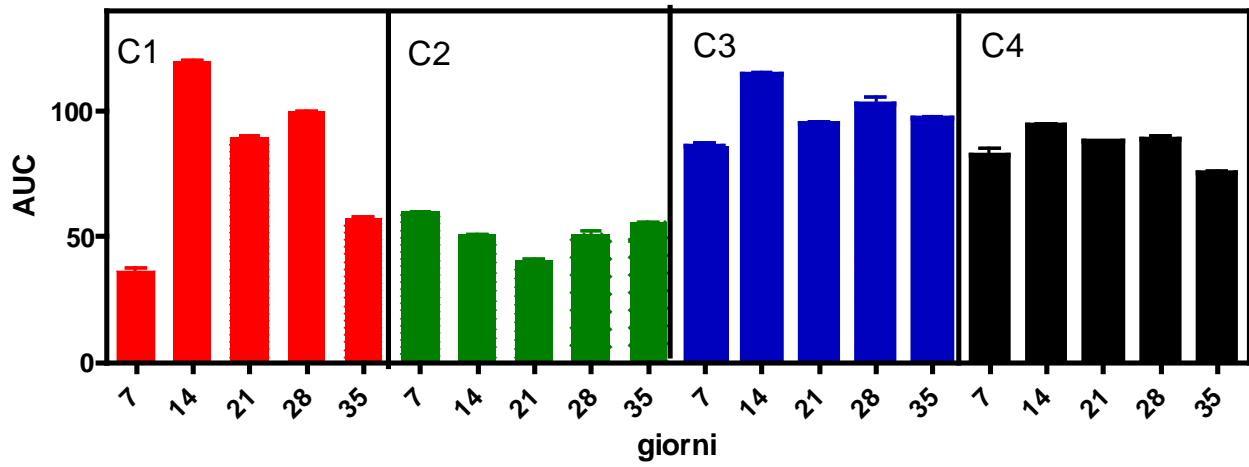


Fig. 6

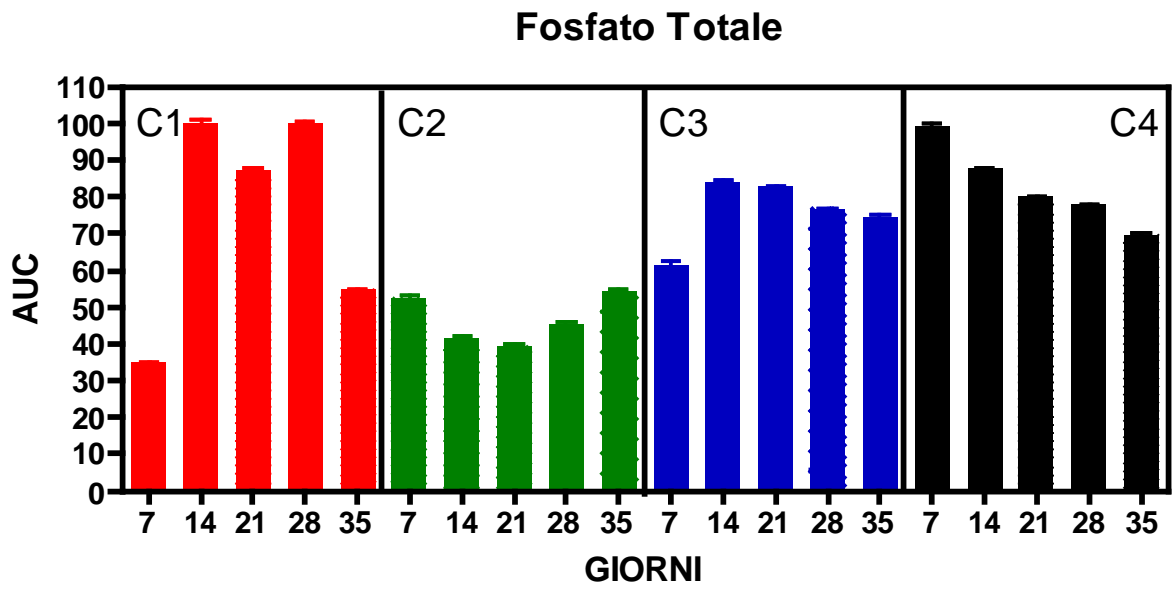


Fig. 7

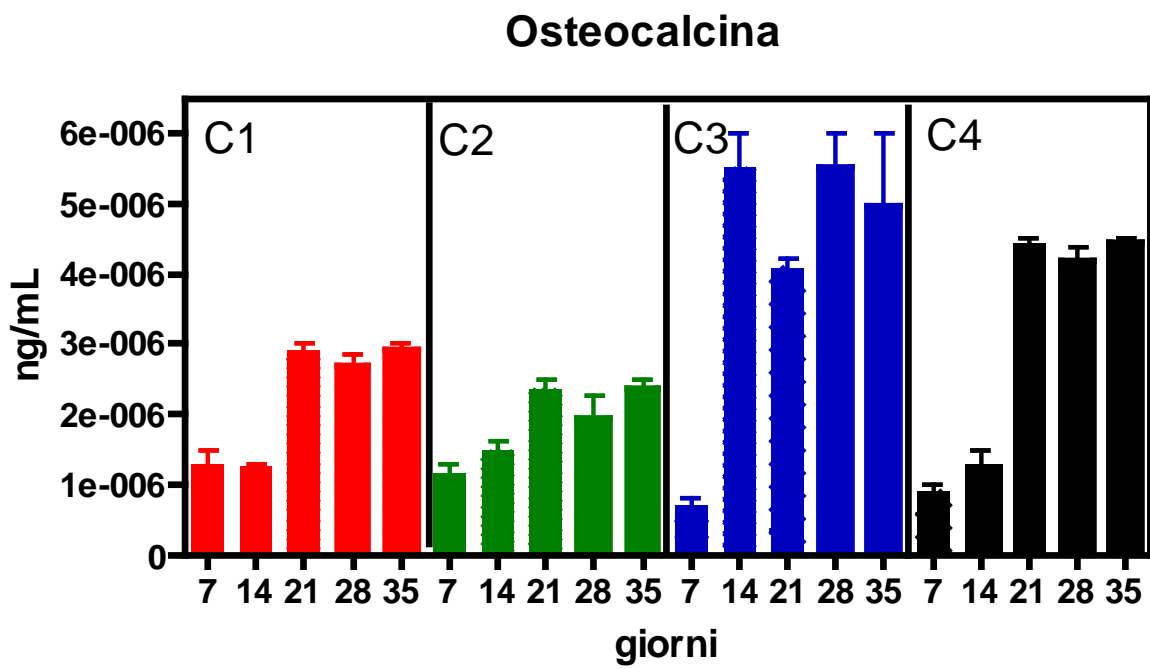
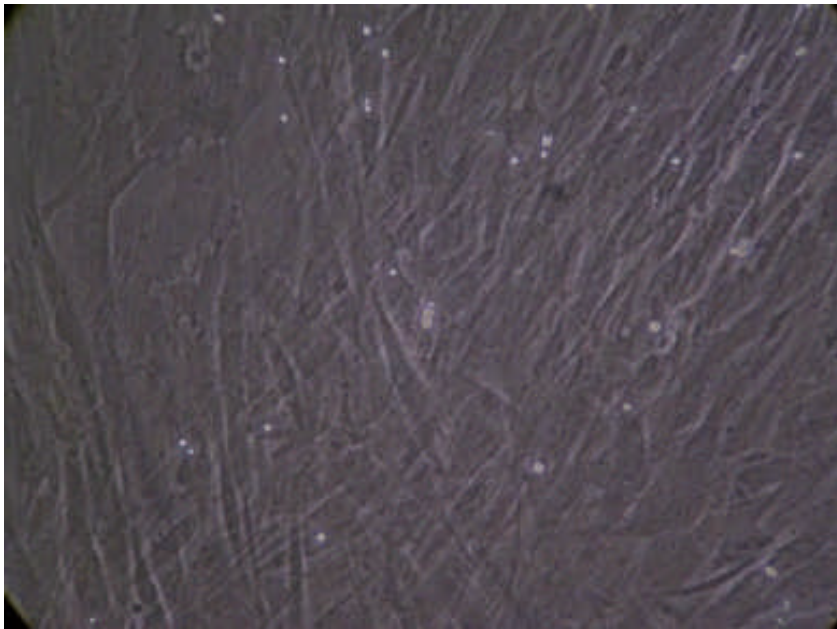
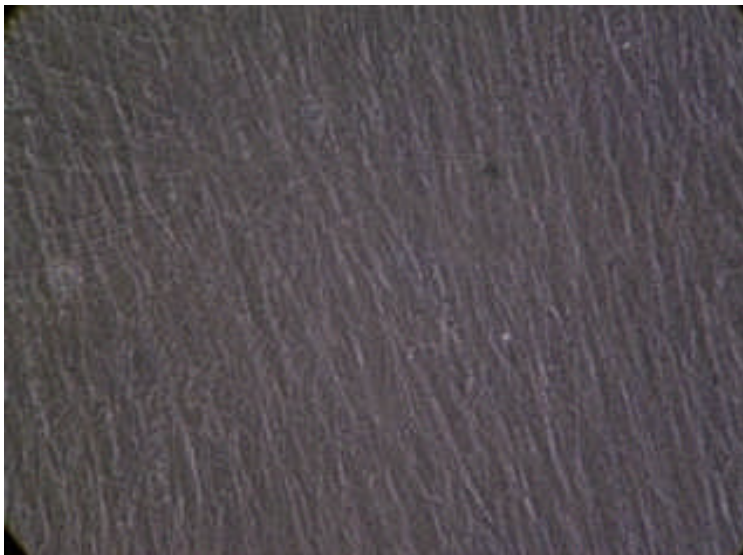


Fig. 8



Osteoblasti umani dopo 35 gg di coltura su plastica



Fibroblasti pulpari dopo 35 gg di coltura su plastica