

Citotoxicitatea hidrogelurilor testate a fost evaluată *in vitro* pe linia celulară MG-63 și pe celule mesenchimale prin microscopie și cu ajutorul kiturilor CellTox™ Green Cytotoxicity Assay (Promega) și ROS-Glo™ H₂O₂ Assay (Promega). Hidrogelurile au fost testate ca atare, și după spălare în TFS (pentru îndepărtarea unor posibile impurități).

Kitul CellTox™ Green Cytotoxicity Assay (G8743, Promega) cuantifică modificările integrității membranare ce apar în urma morții celulei. Această metodă utilizează un colorant cianinic asimetric care este exclus din celulele vii, însă patrunde în celulele moarte și marchează ADN-ul acestora. După legarea de ADN, fluorescența colorantului crește, semnalul fluorescent produs de legarea colorantului la ADN-ul celulei moarte fiind proporțional cu citotoxicitatea. Celulele viabile nu determină creșterea fluorescenței.

Rezultatele noastre au aratat că îndepărtarea impuritatilor prin spălare crește viabilitatea celulară (Fig 1). Totuși, cei mai toxici compuși au fost cei conținând cantitatea cea mai mare de ZnO.

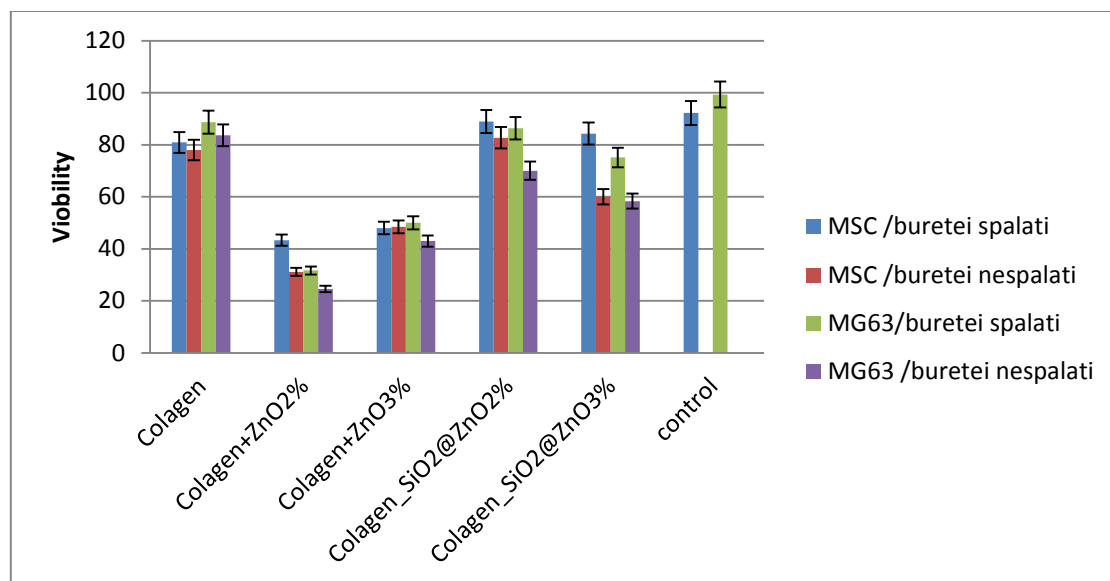


Fig. 1. Evaluarea citotoxicității materialelor nanostructurate utilizând kitul CellTox™ Green Cytotoxicity Assay.

Testul ROS-Glo™ H₂O₂ este o analiză bazată pe luminescență, omogenă, rapidă și sensibilă, care măsoară nivelul peroxidului de hidrogen (H₂O₂), o specie reactivă de oxigen (ROS), direct în cultură celulară. Această analiză permite identificarea condițiilor sau a compușilor de testare, cum ar fi inhibitori sau inductori ai moleculelor mici, care modifică nivelele ROS.

Dintre hidrogelurile compozite pe baza de nanoparticule anorganice și collagen cele mai toxice au fost hidrogelurile utilizate în testări ca atare. Acestea au indus moartea celulară în procent mai mare de celule în comparație cu cele spălate în TFS. De asemenea, în cazul acestora se observă și o creștere a cantității de radicali liberi, corelate cu moartea celulară. Toxicitatea mai scăzută în cazul hidrogelurilor compozite testate ce au fost spălate în TFS poate fi explicată prin scăderea concentrației de solvenți, materii prime și a altor impurități eliminate prin procedeul de spălare.

De asemenea, bureteii de collagen precum și cei de collagen și nanoparticule (aprox. 0,5 cm²) au fost introdusi în duplicat într-o placă de 24 godeuri. Un exemplar a fost lasat ca atare, iar un altul a fost spalat de 3 ori cu tampon fosfat salin. Ulterior au fost adaugate celulele stem mezenchimale (MSC) (în concentrație 1x 10⁵ celule/godeu) în mediu alfaMEM (MSC) suplimentat cu 10% ser fetal bovin și menținut la 37°C cu 5% CO₂. La 24h celulele au fost recoltate prin tripsinizare, fixate în etanol 70% rece și colorate pentru ciclul celular.

Compușii nu modifica drastic procentul de celule aflate în diferitele faze ale ciclului celular. Totuși s-a observat o creștere a fazei G1 indusa de collagen ZnO3%.

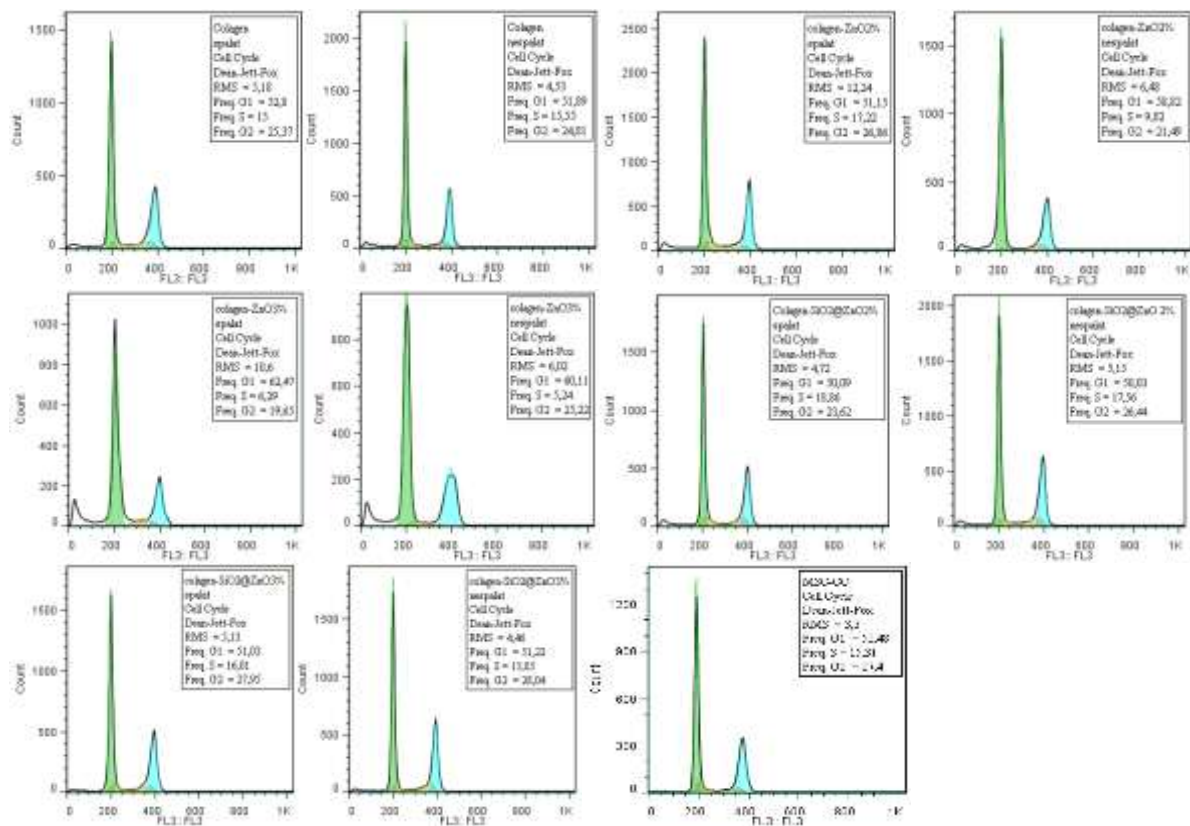


Fig. 2. Analiza modificarilor ciclului celular a celulelor stem mezenchimale crescute in prezenta hidrogelurilor nanostructurate cu Zn și SiO₂ (spalate și nespalate).(Z00199477)