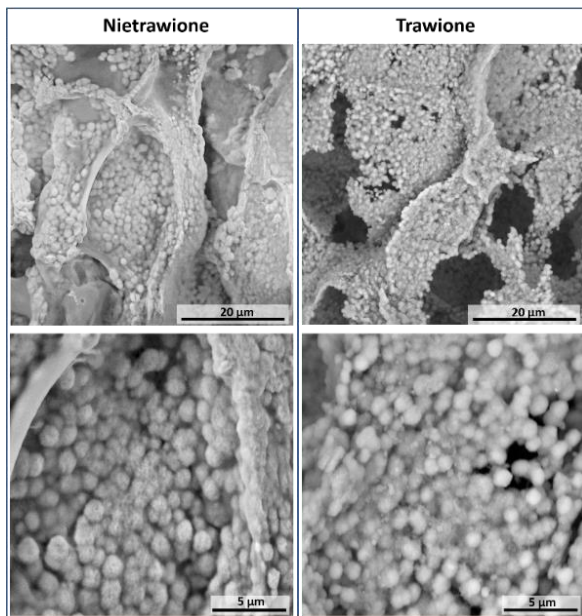


## Zaawansowana analiza depozytów wapnia i czynników wzrostu w chrząstce nasadowej celem dokładnego poznania fizjologii kostnienia oraz poprawy przydatności klinicznej biomateriałów stymulujących kościotworzenie

Projekt jest kontynuacją naszej poprzedniej pracy badawczej, w której scharakteryzowaliśmy przestrzenną architekturę chrząstki nasadowej, jako naturalnego rusztowania do budowy kości. Dlatego należy wyjaśnić, co to jest chrząstka nasadowa. Kości długie składają się z trzonu i przeważnie dwóch nasad. Trzon jest oddzielony od nasady przez chrząstkę nasadową, która odpowiada za ciągły wzrost kości, u ludzi trwający do 18-20 roku życia. Pole styku pomiędzy trzonem i chrząstką nasadową nazywa się przynasadą (metaphysis). Komórki (chondrocyty) rozmnażają się w chrząstce nasadowej w sposób ciągły, a zbliżając się do przynasady, w której rozpoczyna się tworzenie kości, powiększają się (ulegają hipertrofii). Szeregi rozmnażających się chondrocytów są rozdzielone przez podłużne przegrody, będące wytworzoną przez chondrocyty pozakomórkową macierz. Przegrody te, w pobliżu przynasady, wapnieją z wytworzeniem krystalizujących fosforanów wapnia. Do strefy zwapnienia wnikają naczynia włosowate oraz towarzyszące im komórki, które w kontakcie ze zwapniałą macierzą, różnicują się w komórki kościotwórcze (osteoblasty) i rozpoczynają proces powstawania kości. Osteoblasty i chondrocyty wytwarzają kilka rodzajów białek morfogenetycznych kości (BMPs) zwanych czynnikami wzrostu. Stymulują one tworzenie chrząstki i kości. Czynniki te są wytwarzane i obecne w chrząstce nasadowej, ale dotychczas nie wiadomo, które spośród nich oraz w jakim stężeniu występują w zwapniałej części chrząstki.



Celem obecnego projektu jest zbadanie tego zagadnienia, w nadziei, że może to przyczynić się do wytwarzania nowego rodzaju bioimplantów, zdolnych do pobudzania tworzenia kości w podobny sposób jak to się dzieje na styku chrząstki nasadowej i przynasady. Do badań użyjemy zwapniałej chrząstki cielęcej. Złogi wapnia są rozproszone w niezwapniałej macierzy przegród podłużnych i dlatego należy wyjaśnić, które czynniki są obecne w niezwapniałej macierzy, a które są ukryte w obrębie złogów wapnia. Sytuację tę ilustrują przedstawione zdjęcia wykonane elektronowym mikroskopem skaningowym. Widać na nich złogi wapnia w nietrawionej chrząstce, i po strawieniu chrząstki enzymami proteolitycznymi. Rozpuszczenie soli wapnia za pomocą HCl ujawnia cienką płytkę macierzy chronioną przez złogi wapnia od kontaktu z enzymami. W pierwszym etapie badań czynniki wzrostu zostaną wyekstrahowane z niezwapniałej macierzy, oczyszczone za pomocą

chromatografii powinowactwa i zidentyfikowane z użyciem testu immunoenzymatycznego (ELISA). Następnie złogi wapnia zostaną rozpuszczone, i przypuszczalnie obecne w nich czynniki wzrostu będą wykrywane jak podano poprzednio. Ponadto, częściowo oczyszczone białka z niezwapniałej chrząstki i złogów wapnia będą zsekwencjonowane w Laboratorium Spektrometrii Masowej, aby wykryć, jakie są w nich obecne inne białka, poza czynnikami wzrostu. Formułujemy hipotezę mówiącą, że podczas tworzenia kryształów wapnia w obrębie wapniejącej chrząstki adsorbują się na nich czynniki wzrostu, które stymulują tworzenie kości. Analizę depozytów wapnia oraz występujących w nich białek (pripuszczalnie czynników wzrostu) będziemy prowadzić przy użyciu zaawansowanych metod badawczych, takich jak fourierowska spektroskopia w podczerwieni, spektroskopia Ramana, dyfrakcja rentgenowska i wysokiej rozdzielczości elektronowa mikroskopia skaningowa oraz transmisyjna. Nasza hipoteza może być zasadna lub nie, ale niewątpliwą korzyścią płynącą z planowanych badań będzie szczegółowe scharakteryzowanie depozytów wapnia oraz określenie, jakie czynniki wzrostu i w jakiej ilości występują w krytycznym, z fizjologicznego punktu widzenia, miejscu tworzenia kości. Na podstawie tych obserwacji sporządzimy bioimplanty z analogiczną kombinacją czynników wzrostu, aby określić ich zdolność do pobudzenia procesu kościotworzenia za pośrednictwem badań biologicznych na modelu zwierzęcym.