



# Standardisering van tegnieke vir sellulêre beennavorsing

**Authors:**

A.E. Kasonga<sup>1</sup>  
S. Marais<sup>1</sup>  
J.C.A. Boeyens<sup>1</sup>  
M.C. Kruger<sup>2</sup>  
M. Coetzee<sup>1</sup>

**Affiliations:**

<sup>1</sup>Department of Physiology,  
University of Pretoria,  
South Africa

<sup>2</sup>Institute for Food, Nutrition  
and Human Health, Massey  
University, New Zealand

**Correspondence to:**

A. Kasonga

**Email:**

abe.kasonga@up.ac.za

**Postal address:**

Private Bag X11, Arcadia  
0007, South Africa

**How to cite this article:**

Kasonga, A.E., Marais, S.,  
Boeyens, J.C.A., Kruger,  
M.C. & Coetzee, M., 2014,  
'Standardisering van tegnieke  
vir sellulêre beennavorsing',  
*Suid-Afrikaanse Tydskrif  
vir Natuurwetenskap en  
Tegnologie* 33(1), Art.  
#1215, 1 page. [http://  
dx.doi.org/10.4102/satnt.  
v33i1.1215](http://dx.doi.org/10.4102/satnt.v33i1.1215)

**Note:**

This paper was initially  
delivered at the School of  
Environmental Sciences  
and Development of the  
North-West University,  
Potchefstroom Campus,  
South Africa on  
05 October 2012.

**Copyright:**

© 2014. The Authors.  
Licensee: AOSIS  
OpenJournals. This work  
is licensed under the  
Creative Commons  
Attribution License.

**Read online:**

Scan this QR  
code with your  
smart phone or  
mobile device  
to read online.

**Standardisation of techniques for bone cellular research.** Bone remodelling is a continuous process involving osteoclasts and osteoblasts. Long chain polyunsaturated acids (LCPUFA) are known to assist in bone disorders that disrupt the remodelling process. Methods to study the effects of LCPUFAs on bone cells *in vitro* have been standardized for future studies.

Hermodellering van been is 'n deurlopende proses en word bemiddel deur beenresorpsie deur osteoklaste en beenvorming deur osteoblaste. Osteoklaste is meerkernige selle wat ontstaan vanaf hematopoëtiese voorgangers. Hierdie voorgangerselle differensieer na osteoklaste wanneer dit blootgestel word aan reseptor-aktiveerder van nukleêre faktor-kappa B ligand (RANKL) en makrofaagkolonie-stimulerende faktor (M-CSF), wat deur osteoblaste geproduseer word. Studies het getoon dat dieetvetsure, soos langketting poli-onversadigde vetsure (LKPOV) 'n rol speel in beenregulering. Werk in ons laboratorium het getoon dat LKPOV die vorming en resorberende vermoë van osteoklaste, afkomstig vanaf RAW 264.7 muismakrofae, inhibeer. Hierdie navorsingsprojek fokus tans op die effekte van LKPOV op CD14+ mensmonosiete en die tegnieke om dit te bestudeer word tans gestandaardiseer.

RAW 264.7 muismakrofae is teen 2500 tot 10 000 selle per putjie in 'n 96-putplaatjie gesaai en vir twee dae gelaat om te groei, waarna die AlamarBlou-toets daarop uitgevoer is. Hierdie toets is 'n tydbesparende en bekostigbare metode om die hoeveelheid lewende selle in kultuur te kwantifiseer sonder om die selle te beskadig. Die AlamarBlou-toets word gebruik terwyl die selle in kultuur is omdat dit gebaseer is op 'n ensiemreaksie wat tot 'n kleurverandering lei. Nadat hierdie toets uitgevoer is, is dieselfde selle opeenvolgend vir kristalvioletoleuring of tartraatweerstandige-suurfosfatase (TRAP)-aktiwiteitbepaling in osteoklaste gebruik. 'n Kenmerk van volwasse osteoklaste is dat dit die ensiem tartraatweerstandige-suurfosfatase (TRAP) sintetiseer. Hierdie verskynsel word algemeen in navorsing gebruik as bevestiging van osteoklastogenese. Die gebruik van para-nitrofenolfosfaatsubstraat om die TRAP-aktiwiteit in volwasse osteoklaste te bepaal is onlangs in ons laboratorium gestandaardiseer. Hierdie metode neem slegs 1 h in vergelyking met die kommersieel-beskikbare TRAP-toetsstelle en is baie sensitief. 'n Belangrike eienskap van volwasse osteoklaste is dat hulle been resorbeer. Navorsing op bees-beenskyfies is egter baie duur en kultuurplaatjies wat bedek is met 'n sintetiese anorganiese beenoppervlak word dikwels as plaasvervanger vir been gebruik. Die visualisering van resorpsie-put vorming op Corning® OsteoAssay-plaatjies is 'n dus 'n noodsaaklike toets om te bepaal of LKPOV die resorpsievermoë van osteoklaste beïnvloed. As gevolg van swak kontras tussen die resorpsie-oppervlak en die resorpsieputjies, is 'n gemodifiseerde von Kossa-kleuring gebruik om die kontras te verbeter. NIH Image J sagteware is verder gebruik om die kwaliteit te verbeter en foto's van resorpsieputjies te ontleed. Die resultate toon 'n verbeterde beeldkwaliteit en ontleding na implementering van hierdie tegnieke. Die navorsingsgroep bestudeer ook die *in vitro* effekte van LKPOV op osteoklast-osteoblast koëkulture om die interaksies tussen hierdie twee beenselle te ontleed. RAW 264.7 monosiete en MC3T3-E1 pre-osteoblaste is saamgevoeg en 'n studie is uitgevoer om die konsentrasies van selle en reagentse te standaardiseer waarby hierdie twee selstipes saam gekweek kan word. Die tegnieke wat ontwikkel is, sal toegepas word in toekomstige sellulêre beennavorsing in ons laboratorium. Hierdie studie is befonds deur die MNR en NAVKOM (UP).