

INTERAKCE SLITINY KOVU A BUNĚČNÉ LINIE

MONIKA HOMOLKOVÁ^a a VÍTĚZSLAV
BŘEZINA^b

^a Laboratoř tkáňových kultur, Ústav komplexních systémů, Fakulta rybářství a ochrany vod, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zámek 136, 373 33 Nové Hradky,
^b Stomatologické výzkumné centrum LF MU Brno, Komen-
ského nám. 2, 662 43 Brno
homolkova@frov.jcu.cz

Došlo 20.1.14, přepracováno 13.3.14, přijato 27.3.14.

Klíčová slova: slitina kovu, materiál, interakce, buněčná linie, kolonizace, kultivace

Úvod

Nově vznikající a vyvíjené materiály se zcela odlišnými fyzikálními vlastnostmi (např. slitiny kovů, povrchové vrstvy, nanomateriály) určené zejména pro zdravotnictví a biotechnologie, vyžadují vývoj a vznik nových metod a postupů k vyjádření vztahu mezi povrchem neživého materiálu a buněčnou populací. Dosavadní metody ne zcela vyhovující novým trendům jsou předmětem normy ČSN EN ISO 10993-1 (cit.¹).

Interakce mezi implantovaným materiálem a biologickým prostředím jsou závislé na povrchu materiálu a jeho vlastnostech. Interakce umožňují kontrolovat množství a kvalitu buněčné adheze na povrchu materiálu a následný růst buněk². Testy biokompatibility *in vitro* jsou vyvinuty pro simulaci a předpovězení biologické reakce na materiálu, které mohou být umístěny na povrchu nebo uvnitř těla³.

Současná naše práce se zabývá přímou reakcí buněk na zkoušený materiál s pořízením obrazového záznamu. Reakce musí být vyhodnocena a posouzena jako model *in vitro*. Buňky jsou inokulovány na povrch vzorku materiálu a tam kultivovány. V práci prezentujeme model, pomocí něhož lze stanovit, jak jsou buněčné populace schopny kolonizovat povrch materiálu.

Experimentální část

Materiály

Titanové slitiny jsou převážně používány jako materiály pro lékařské implantáty. Jsou obecně považovány za chemicky inertní, biologicky kompatibilní s lidskou tkání a odolné vůči korozi lidských tělních tekutin⁴.

Chemické kompozity nebo různé povrchy titanových implantátů se liší v závislosti na jejich složení a objemu povrchové úpravy. Komerčně čistý titan má různé stupně

čistoty (tříděné od 1 do 4). Tato čistota je charakterizována kyslíkem, uhlíkem a obsahem železa⁵. Titan Grade 2 je komerčně čistý titan se stopovými přímíseninami. Je nejvíce používaným druhem titanu na průmyslové aplikace ve všech formách polotovarů. Nabízí optimálně vyváženou kombinaci pevnosti a tažnosti⁶. Titan Grade 5 je slitina titanu s dalšími prvky (Ti6Al4V) a je nejrozšířenější titanovou slitinou pro dentální i ortopedickou implantologii. Disponuje dobrou korozní odolností, vysokou pevností a relativně nízkou tažností⁷.

Slitiny kovů použitých jako modely pro nově prezentovanou metodu byly Titan Grade 2 a Titan Grade 5.

Požadavky na tvar zkoušeného materiálu

Zkoušený vzorek musí mít vodorovnou polohu plochy určenou ke stanovení kolonizace. Tato poloha je nejlépe dosažena, jsou-li protilehlé plochy rovnoběžné, přičemž nezáleží na tvaru protilehlých stran. Nejlépe vyhovují válcové tvary, kdy zkoušená vrchní plocha je rovnoběžná s plochou spodní, která je v kontaktu se dnem kultivační misky.

Titan Grade 2 použitý pro tuto práci měl v průměru 9,94 mm a výšku 2,86 mm, jeho povrch byl leštěný. Druhým vzorkem byl Titan Grade 5 o průměru 7,92 mm s výškou 2,93 mm rovněž s leštěným povrchem.

Buněčná linie

Buněčná linie použitá pro interakci s danými materiály byla MG63. Jedná se o heteroploidní buněčnou linii získanou z lidského osteosarkomu. Buněčné linie jsou pořizovány z European Collection of Cell Cultures a kultivovány dle specifických podmínek každé buněčné linie. Tato buněčná linie použitá pro tento test je kultivována v MEM (Minimální esenciální médium s Earleovými soli, bez L-glutaminu, firma GE Healthcare) s 10% přidávkou bovinního fetálního séra (firma PAA).

Kultivační podmínky

Teplota v kultivačním zařízení je 37 °C. Vzdušná vlhkost se pohybuje kolem 90 % s neustálým přívodem CO₂ na úrovni 5 %. Pro zahájení pokusu je potřeba dodržet shodné kultivační podmínky (na vzorky je použita suspenze buněk z jedné kultivační nádoby a z jedné pasáže, při dodržení stejné doby expozice). Osteoblasty jsou enzymově uvolněny z polystyrenové kultivační lahve přidáním přibližně 500 ml trypsinu EDTA (10×), (firma PAA). Suspenze buněk je napočítána v Burkerově komůrce a inokulována do kultivačního média ke vzorku materiálu dle velikosti plochy kultivační nádoby o hustotě 3500 buněk/cm². Velikost plochy kultivační nádoby se zvolí tak, aby plocha, na které je umístěn vzorek materiálu, byla z větší části zakryta plochou použitého vzorku materiálu. Kultivační doba je zvolena podle použité buněčné linie, obvykle tak, aby zahrnovala alespoň tři buněčné cykly (zpravidla 72 hodin). Po kultivaci je buněčná populace fixována

a obarvena některou z obvyklých technik a následně je pořízen obrazový záznam povrchu materiálu s buňkami.

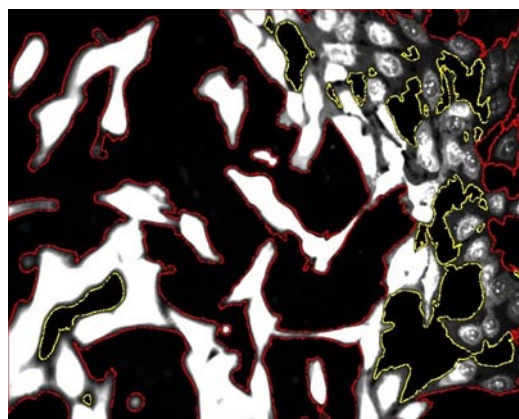
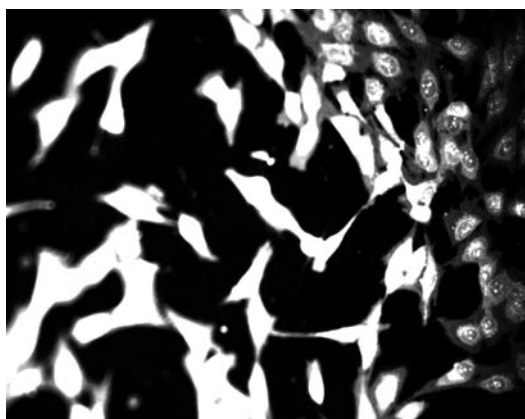
Obrazové záznamy

Obrazové záznamy jsou pořízeny v mikroskopu v dopadajícím světle. Z každého povrchu vzorku materiálu je pořízeno 32 obrazových záznamů. Tyto jsou pořizovány metodou náhodného výběru, řádkovací metodou.

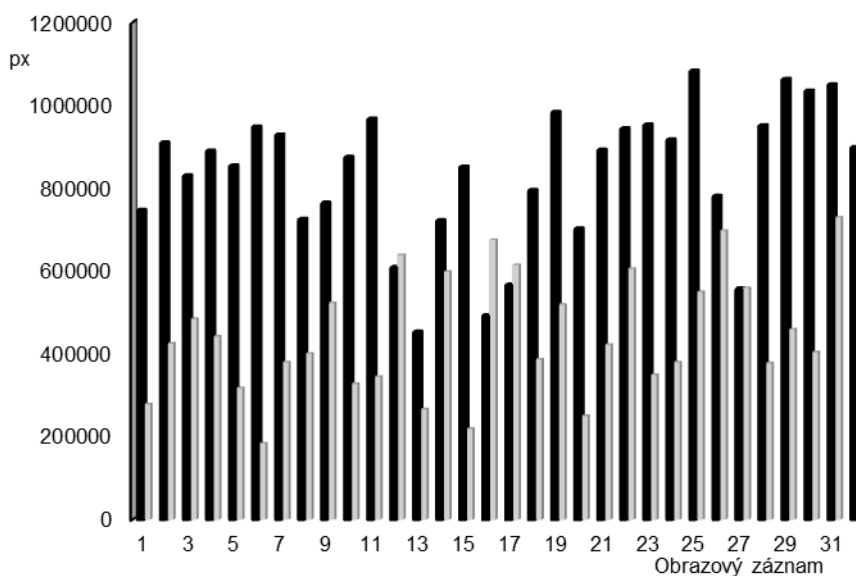
Vyhodnocení záznamů a statistické analýzy

Obrazové záznamy jsou hodnoceny tak, že plochy kolonií buněk v každém pořízeném snímku jsou obkresle-

ny, anebo jsou podrobeny automatizovanému stanovení. Je počítán součet ploch kolonií buněk a porovnán s plochou celého zorného pole. Každý materiál je vzorkován po 32 náhodně zvolených obrazových polí a z nich je usuzována plocha, kterou buňky kolonizují zkoumaný materiál (obr. 1). Součástí prezentované metody je softwarový program v jednoduché variantě, je však možno užít i jiných, přístupných programů. Výsledkem je stanovení procenta buňkami kolonizovaných ploch. Tato data jsou přístupná dalším běžným statistickým metodám.



Obr. 1. TiGr5 zobrazen kontrastní technikou (barveno fluorescencí) bez a s obkreslením buněčných struktur



Obr. 2. Plocha kolonizace povrchu u vzorků materiálu TiGr2 (černý sloupec) a TiGr5 (šedý sloupec) na pořízených 32 obrazových záznamech po uplynutí kultivační doby 72 hodin

Výsledky a diskuse

Statistické zhodnocení

Jako ověření správnosti použitelnosti této metody jsme zvolili Gausovo rozdělení jako rozdělení pravděpodobnosti spojité náhodné veličiny. Při stanovení koeficientu hladiny významnosti na úrovni 5 % byla zjištěna pro oba sledované materiály nezamítnutá nulová hypotéza, tudíž oba sledované materiály patřily do základního souboru.

Interakce heteroploidní buněčné linie MG63 byla rozdílná pro zkoumané materiály TiGr2 a TiGr5. Na materiálu TiGr2 bylo zjištěno procento kolonizace na úrovni 63,68 %, což bylo vyšší než procento u materiálu TiGr5, které činilo 34,12 % za sledovaný čas 72 hodin.

Materiály, které se běžně používají pro svoji biokompatibilitu (např. pro dentální implantáty), jsou běžně vyráběny z kovů a jejich slitin. Na interakci mezi buněčnou linií a biomateriálem i na adhezi buněk má vliv pohyblivost buněčné populace, proliferace a syntéza proteinů extracelulární matrix⁸.

Zvolený čas interakce pro kultivaci buněčné linie s materiálem byl vybrán na základě kultivační doby tak, aby zahrnoval alespoň tři buněčné cykly⁹. V jiných studiích byla srovnávána buněčná adheze osteoblastů na materiálech z hliníku a titanu v kratších časových intervalech čítajících 0,5, 1, 2 a 4 hodiny při stejném množství inokulované buněčné suspenze s 3500 buňkami/cm² na plochu kultivační nádoby při použití shodných kultivačních podmínek použitých pro tuto metodu¹⁰. Jako hladina významnosti byla pro metodu kolonizace na materiálech TiGr2 a TiGr5 zvolena hranice 5 % oproti často používané hladině

významnosti na úrovni 1 % pro experimenty při sledování adheze osteoblastů na materiálech s odlišným složením¹¹.

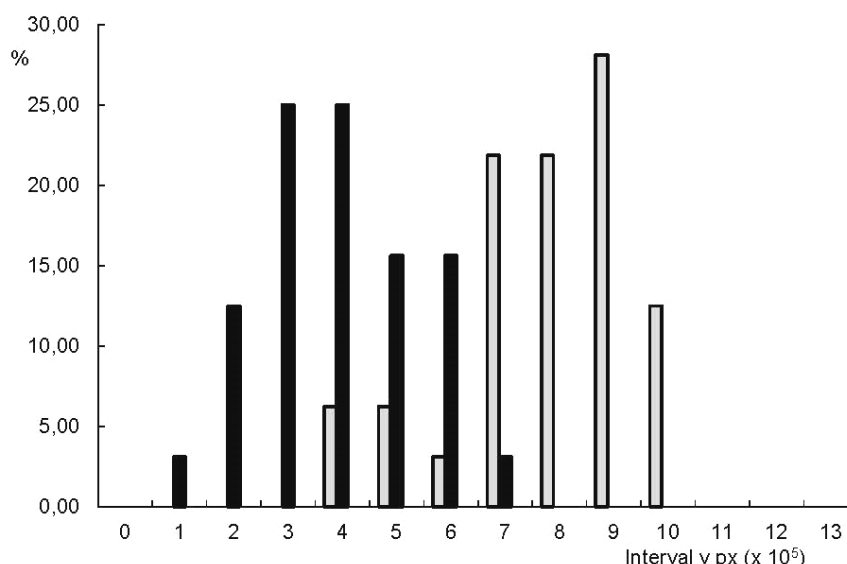
Závěr

Cílem této práce bylo zjištění interakce buněčné linie s neprůhledným povrchem u slitin kovů používaných pro lékařské implantáty, s pořízením obrazového záznamu. Tato práce ukázala interakci a procentický rozdíl obsazenosti plochy u použitých vzorků materiálu TiGr2 a TiGr5 buněčnou linií MG63. Více se buněčná linie MG63 kolonizovala na povrchu vzorku materiálu TiGr2 oproti druhému vzorku TiGr5 při stejné době expozice a kultivačních podmínkách.

Práce byla podpořena projektem GAČR P503/12/0337 a projektem CENAKVA II číslo LO1205 (v rámci programu NPU I).

LITERATURA

1. ČSN EN ISO 10993-1: Biologické hodnocení zdravotnických prostředků – Část 1: Hodnocení a zkoušení v rámci procesu řízení rizika (červen 2010).
2. Bagno A., Bello C.: J. Mater. Sci. 15, 935 (2004).
3. Hanks C., Wataha J., Sun Z.: Dent. Mater. 12, 186 (1996).
4. Latysh V., Krallics G., Alexandrov I., Fodor A.: Current Appl. Phys. 6, 2 (2006).
5. Steinemann S.: Periodontology 2000 17, 7 (1998).



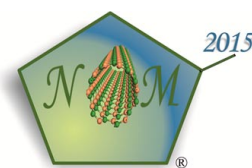
Obr. 3. Relativní četnost kolonizace povrchu materiálu TiGr2 (šedý sloupec) a TiGr5 (černý sloupec) při interakci povrchu materiálu – buněčná linie MG63 za 72 hodin

6. Adamus J.: Key Eng. Mater. 2009, 410.
7. Poondlaa N., Srivatsanb T. S., Patnaika A., Petrarolic M.: J. Alloys Compd. 486, 162 (2009).
8. Webster T. J., Ergun C., Doremus R. H., Siegel W. R., Bizios R.: Biomaterials 21, 1803 (2000).
9. Webster T. J., Siegel W. R., Bizios R.: Biomaterials 20, 1221 (1999).
10. Webster T. J., Ergun C., Doremus R. H., Siegel W. R., Bizios R.: Biomaterials 22, 1327 (2001).
11. Webster T. J., Hellenmeyer E. L., Price R. L.: Biomaterials 26, 953 (2005).

M. Homolková and V. Březina (*Laboratory of Tissue Culture, Institute of Complex Systems, Faculty of Fisheries and Protection of Waters, University of South Bohemia in České Budějovice, Nové Hradky and Department of Stomatology, Faculty of Medicine, Brno*): **Interaction of Metal Alloys and Cell Lines**

Metals and their alloys show a variety of applications in health care and biotechnologies. The ability of metal alloys to be used in practice is significantly affected by interaction with a cell line in a given environment. Biological tests *in vitro* show the applicability of metal alloys on the implant surface. This work demonstrated the ability of the cell line MG63 to colonize the sample surface of different compositions of the material.

18. – 21. 5. 2015 Ostrava, aula VŠB-TU Ostrava NanoOstrava 2015 - 4th Nanomaterials and Nanotechnology Meeting



Centrum nanotechnologií, VŠB-TU Ostrava Vás srdečně zve na čtvrtý ročník mezinárodní vědecké konference NanoOstrava 2015, jež bude opět místem pro setkání a rozhovory mezi vědci, studenty a zástupci firem se zájmem o rozvoj v oblastech nanomateriálů a nanotechnologií. Konference se zaměří na nejnovější pokroky a výsledky výzkumu týkající se nanomateriálů pro medicínu, pokročilých nanomateriálů, nanomateriálů pro elektronická zařízení, nanokompozitů či nanouhlíkatých materiálů. V rámci vědeckého programu vystoupí s plenárními přednáškami zvané osobnosti z významných světových vědeckých pracovišť. Účastníci konference budou mít možnost publikovat své příspěvky v některém z renomovaných vědeckých časopisů. Stejně jako v minulých ročnících se můžete těšit na bohatý doprovodný a sociální program.

Příjem abstraktů přednášek a posterů bude probíhat do 20. dubna 2015, registrace do 17. května 2015 a zaslání konferenčního příspěvku do 20. června 2015.

Pro více informací, prosím, navštivte stránky www.nanoostrava.cz

Za organizační tým: Gražyna Simha Martynková, Sylva Holešová, Daniela Plachá, Karla Čech Barabaszová, Vladimíra Plačková