

Technologie výzkumu kvality povrchů materiálů s živými buňkami in vitro

Autoři: Ing. Vítězslav Březina, CSc. – vývojová laboratoř LF MU Brno | Ing. Jan Kreisler – MedConcept, s.r.o., Brno

Kvalita materiálů dostatečně akceptovatelná buňkami a tkáněmi je prvním krokem při testování nově vyvinutých materiálů. Obvykle se zkoumají vlastnosti chemické, následují vlastnosti fyzikální a konečný test zahrnuje zkoušky biologické. Ty jsou přísně normovány současně v normě ISO 10 995. Každý materiál, určený pro zdravotnictví musí této normě vyhovovat, pokud je sériově vyráběn a distribuován.

Na druhé straně však stojí vývojová základna ať už podniková nebo akademická, jejímž úkolem je vyvíjet nejenom nové materiály na bázi vědeckých poznatků, ale také se podílet na vývoji nových zdravotnických technologií. Nové technologie se týkají nejenom vlastních materiálů použitých například v implantologii, ale také na nových metodách pro ověřování kvality testování a také na interpretaci výsledků testovacích baterií. To vede k racionálnímu využití materiálů tak, aby byly dobře akceptovány živou tkání, popřípadě při užití degradabilních materiálů k nízké nepříjemnosti jejich zbytků pro živé buňky.

Současné metody ověření kvality materiálů anebo jejich výluhů jsou většinou založeny na hodnocení dat, která jsou získána po fixaci buněk a jejich následném obarvení. V případě histologického zpracování je to podobné, stejně jako po využití elektronové mikroskopie. Vždy hodnotíme stav buněk nebo tkání po nějaké době růstu na materiálu nebo jeho výluhu. Výjimku tvoří růstové schopnosti buněčné populace, které se provádějí v kulturačních nádobách. Závěrečné počítání buněk v narostlé populaci je obvykle zase věc fixování buněk a jejich případné obarvení, je-li zjišťována mortalita. Jiné zkoušky, například test MTT pracuje podobně, obarvení měříme na fotometrech a usuzujeme na metabolickou aktivitu.

Tyto statické metody mají svůj nezastupitelný význam při studiu toxicity materiálů a jednoznačně

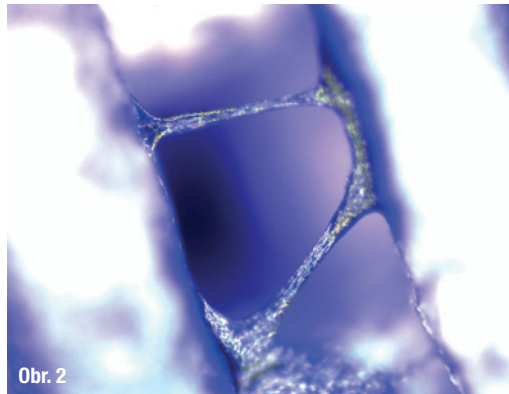


Obr. 1

určují, kdy může být materiál pro aplikaci užít a kdy ne. Vedle těchto metod existují, třebaže poněkud opomíjené, metody řekněme dynamické. Ty jsou založeny na průběžném snímkování rostoucí buněčné populace, samozřejmě in vitro. Princip sběrného snímkování je znám od doby samotného vynálezu fotografie a zajímavé je, že první využití bylo v biologii. Moderně se metodě říká „live cell dynamic image“, český termín je již 100 let znám jako „sběrná kinematografie“, což ovšem nemá nic společného s dramatickými pořady některých tvůrců filmových dokumentů. V našem případě jde o sběrnou mikrokinematografii, to znamená postupné snímkování zorného pole mikroskopu, kde se odehrávají fyziologické buněčné jevy. Snímkuje tedy chování buněčné populace v materiálem pozměněných kulturačních podmínkách. Znamená to, že na výsledném snímku vidíme vzájemně

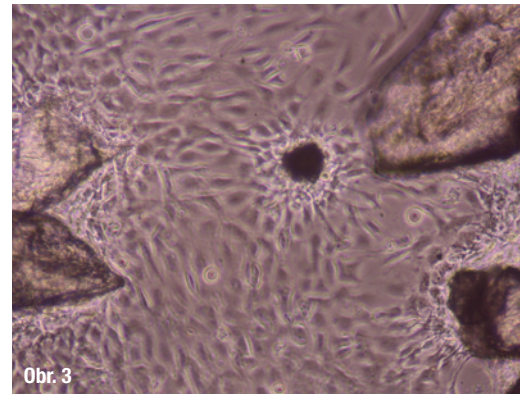
Obr. 1: Konstrukce lešení vhodného pro speciální účely. Buňky jsou rozprostřeny na povrchu trámce scaffoldu. Reakce buněk je pozitivní.

Obr. 2: Mezi trámci scaffoldu se vytváří buněčné můstky. Pokud je lešení degradovatelné, buňky vytváří náhradní tkáň.



Obr. 2

Obr. 3: Rozemletá tvrdá zubní tkáň ve zkouškách in vitro s buňkami MG63. Je vidět afinita buněk k některým zrnům tvrdé zubní tkáně.



Obr. 3

buněčné interakce, interakce buněk s materiálem a hlavně adaptační fázi populace na materiál nebo jeho výluh. Popřípadě také fakt, že zlomky materiálu indukují projevy taxie buněk směrem k úlomku nebo od něj.

Stomatologické výzkumné centrum pod vedením prof. Jiřího Vaňka udělalo pro takové dynamické metody potřebný základ. Bylo ověřeno mnoho základních materiálů pro dentální implantologii a ve spolupráci s výrobními organizacemi a akademickou sférou přispělo k tvorbě zcela nové slitiny pro implantáty. Mnoho otázek však zůstalo otevřeno. Jednou z nich je otázka charakteru povrchu, popřípadě interakce buněk na rozhraní dvou tkání. Přináší to další výzkumné otázky, kladené zejména akademické sféře optických dovedností, to je záznam přímého snímkování chování buněk na neprůhledných površích za současného zviditelnění průsvitných buněčných těl.

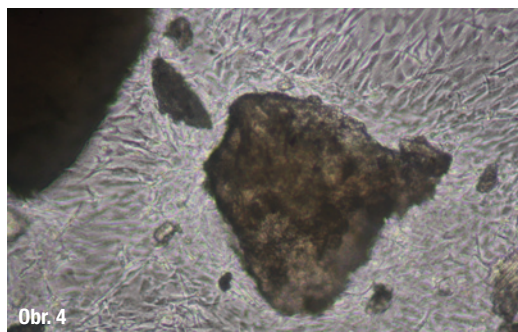
Vedle materiálů umělých, obvykle slitin kovů, popřípadě upravených plastických hmot, je však i zcela reálná cesta k využití buněk či orgánů tělu

vlastních. To platí nejenom pro aplikace implantologické, ale

i pro celou oblast reparace ať již tkáňové nebo buněčné. Jednou z nich je metoda využití dentinu pro augmentaci kostní tkáně, která je už v současnosti využívána ve stomatologii. Její princip je v rozemletí očištěného zubu na úlomky velikosti přibližně 300 μm a jejich aplikaci do zubní jamky, kde tento materiál prostor vyplní a umožní po krátké době další operační zásahy. Jde tedy o skutečný biomateriál s okamžitou aplikací, popřípadě o jeho uchování k aplikacím pozdějším.

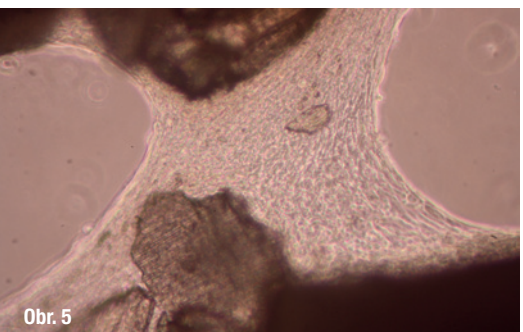
Otázkám přijatelnosti rozemleté zubní tkáně byla věnována pozornost i na vývojovém pracovišti stomatologické kliniky LF MU v Brně a v Laboratoři tkáňových kultur Jihočeské univerzity v Nových Hradech. V podmínkách in vitro byla potvrzena hypotéza o přijatelnosti pomleté tvrdé zubní tkáně kostními buňkami, pochopitelně v modelových pokusech. Bylo nastoleno mnoho dalších výzkumných otázek, které jsou postupně řešeny nejenom na úrovni laboratorní, ale i klinické.

Obr. 4: Afinita k zrnům tvrdé zubní tkáně je vidět na zrnu, které je obaleno buňkami. Předpokládáme, že toto zrno je dentin. Velké zrno v pravé části obrazu je bez buněčného obalu. Předpokládáme, že jde o sklovinu.

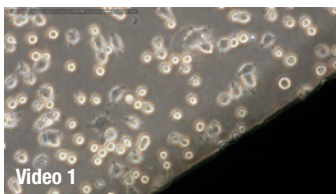


Obr. 4

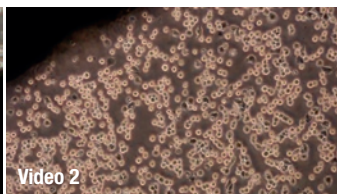
Obr. 5: Mezi zrny tvrdé zubní tkáně se poměrně rychle (cca do 24 hodin) vytváří ucelený buněčný můstek, což může znamenat rychlou tkáňovou reakci



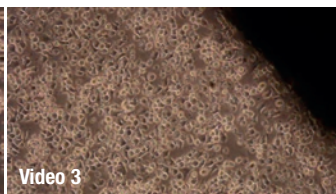
Obr. 5



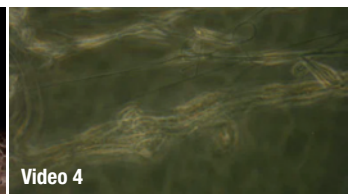
Video 1



Video 2



Video 3



Video 4

Video 1: Zirkon – Pozitivní reakce na vzorek zirkonia. Buňky reagují dobrou adhezí a dilatací, probíhá buněčné dělení

Video 2: Alzina – Kolem vzorku aluminia se postupně vytváří zóna odumírajících buněk, dále od povrchu vzorku jsou buňky živé

Video 3: Indium – Zcela negativní reakce na vzorek india. Buňky reagují odumíráním, a to postupně od hrany vzorku.

Video 4: Nanovláknno – Interakce buněk s mikro- a nanovláknny s PCL. Buňky adherují k vláknu, jsou schopny pohybu a co je důležité – dělí se. Reakce buněk je pozitivní.