proLékaře.cz | 15.8.2025

Titanový terčík modifikovaný hydroxyapatitem a zirkonem nevykazuje známky cytotoxicity

Teuberová Z.[1], Seydlová M.[1], Dostálová T.[1], Jelínek M.[2], Dvořánková B.[3]

[1]Stomatologická klinika 1. LF UK a VFN Praha,
přednosta prof. MUDr. J. Mazánek, DrSc.
[2]Fyzikální ústav AV ČR, Praha,
ředitel Ing. K. Jungwirth, DrSc.
[3]Klinika popáleninové medicíny 3. LF UK Praha,
přednosta MUDr. L. Brož

Souhrn

Práce se zabývá zejména studiem biologických vlastností modelu implantátu povlečeného tenkou vrstvou hydroxyapatitu s mezivrstvou zirkonu. Hodnotící metodou je přímý test cytotoxicity provedený kultivací s myšími a lidskými fibroblasty. Dále byl proveden fyzikální test k analýze a složení krystalové struktury filmu (RTG difrakce), který potvrdil, že se jedná o krystalický hydroxyapatit. Zhodnocením testu cytotoxicity a srovnáním s kontrolními, paralelně kultivovanými vzorky in vitro, docházíme k závěru, že materiál není cytotoxický a je vhodný k dalším detailnějším pokusům.

Klíčová slova: implantát – hydroxyapatit – zirkon – X-ray diffraction – přímý test cytotoxicity

Teuberová Z., Seydlová M., Dostálová T., Jelínek M., Dvořánková B.: Titanium Disc Modified with Hydroxyapatite and Zirconia Does not Reveal Signs of Cytotoxicity

Summary: The paper deals primarily with the study of biological properties of a model of implant covered with a thin layer of hydroxyapatite with an intermediate layer of zirconium. Cytotoxicity was evaluated by direct cultivation with mouse and human fibroblasts. A physical test using X-ray diffraction confirmed that the film is composed of crystalline hydroxyapatite. The evaluation of the cytotoxicity test and a comparison with controlled samples cultured in parallel in vitro made it possible to conclude that the material is not cytotoxic audit is suitable for further experiments in more detail.

Key words: implant – hydroxyapatite – zirconium – X-ray diffraction – direct cytotoxicity test

Prakt. zub. Lék., roč. 53, 2005, č. 1, s. 7–11.

ÚVOD

Velmi úzce spjatou problematikou s brzkým zatížením implantátu je jeho povrchová úprava. Důvody, proč implantáty povrchově upravovat, jsou různé (zvětšení povrchu, rychlejší oseointegrace implantátu atd.). Implantáty lze upravovat jak chemicky leptáním [1], tak mechanicky – zářezy [2], či nejvíce prosazovanou technikou povlakováním povrchu kovového implantátu tenkou vrstvou biokompatibilního materiálu. Rozlišují se dvě základní metody k povlakování – plazma sprayování a pulzní laserová depozice. Od plazma sprayování se vzhledem k jeho negativnímu vlivu na krystalické uspořádání vzorku upouští (viz níže).

Test cytotoxicity se využívá při posuzování biokompatibility materiálu s živou tkání. Rozlišujeme dva testy cytotoxicity, test přímý a nepřímý. V přímém testu cytotoxicity jsou buňky kultivovány v přítomnosti zkoumaného materiálu. U nepřímého testu se dané buňky kultivují v eluátu ze zkoumaného vzorku. V našem hodnocení jsme použili přímý test cytotoxicity.

Metoda pulzní laserová depozice využívá pro nanesení povlakované vrstvy obvykle buď KrF excimerový laser, nebo ArF laser. Tato metoda využívá energie laserového paprsku fokusovaného na terč, ze kterého materiál emitovaný ve formě plazmy kondenzuje na kovový substrát v tenkém filmu [3]. Vlastnosti povrchu naneseného popsanou metodou jsou přímo závislé na depozičních podmínkách a lze tak vytvořit povlaky s různými vlastnostmi [4].

proLékaře.cz | 15.8.2025

Naše práce se zabývá fyzikálními vlastnostmi povlakovaného modelu implantátu ve formě terčíku s mezivrstvou zirkonu – test XRD a dále jsme testovali cytotoxicitu daných vzorků přímým testem in vitro na lidských a liniových myších fibroblastech.

MATERIÁL A METODY

Fyzikální testy

XRD (X-ray diffraction) je fyzikální test fungující na principu detekce odrazu rentgenového záření, kterým je možné analyzovat složení vytvořené vrstvy zkoumaného vzorku a zároveň určit krystalickou strukturu látek ve vzorku obsažených. Složení biokeramické vrstvy jsme získali difrakcí rentgenového záření o vlnové délce 154,056 pm.

Atomy krystalu, pravidelně prostorově uspořádané do krystalové mřížky, tvoří určitou sestavu rovnoběžných rovin, na kterých dochází k rozptylu paprsků záření. Rentgenové záření dopadající na atomy krystalu rozkmitá elektronové obaly atomů a ty se pak stávají zdrojem rozptýleného koherentního záření o vlnové délce shodné s vlnovou délkou dopadajícího záření. Paprsky difraktované rovnoběžnými rovinami spolu za určitých podmínek interferují a vytvářejí difrakční obrazce, které je možné zaznamenat. Zpětnou analýzou těchto obrazců lze vypočítat strukturu krystalu.

Test cytotoxicity

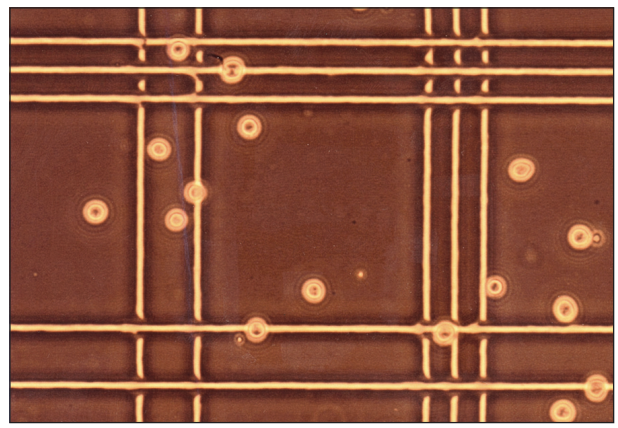
Zkoumaným vzorkem byl titanový terčík s laserově nanesenou vrstvou krystalického hydroxyapatitu a mezivrstvou zirkonu. Pozitivní kontrolou byla kultivace terčíků z keramiky Nori Take. Negativní kontrola spočívala v kultivaci cytotoxické červené pryže (Vegum, Gumárne Dolné Vestenice, SR), která se používá v laboratoři, a terčíku z pryskyřice Superpont C+B, vyrobeného s přebytkem monomeru v poměru 3 g prášku a 5 ml tekutiny proti obvyklému stavu 1:1.

Ve všech případech jsme provedli kultivaci stejného počtu buněk bez přítomnosti jakéhokoliv materiálu a k tomuto počtu byly pak vztaženy počty buněk kultivovaných v přítomnosti terčíků. Použili jsme dva typy buněk: myší liniové fibroblasty (3T3) a lidské fibroblasty (LF) získané kultivací lidské dermis.

Do šestijamkových kultivačních desek s průměrem jamky 3,5 cm (NUNC, Roskilde, Dánsko) jsme nasadili 25 000 buněk resuspendovaných ve 3 ml média do každé jamky.

Bylo použito médium H-MEMd (Výrobna médií ÚMG AV ČR Praha, ČR) s přídavkem antibiotik – gentamycinu ve výsledné koncentraci v médiu 10 μg/ml a penicilinu ve výsledné koncentraci 200 U/ml, dále glutaminu (Sevapharma Praha, ČR) v koncentraci 0,3 mg/ml a 10% bovinního séra (ZVOS Hustopeče, ČR).

Buňky jsme kultivovali v inkubátoru při 37 °C a za tenze CO_2 3,3 % a 100% vlhkosti. Po 24hodinové kultivaci jsme vložili do příslušných jamek vysterilizované terčíky z povlakovaného titanu, keramiky (Nori Take, USA), polymetylmetakrylátu a červené pryže. Třetí a čtvrtý den jsme přidávali vždy 1,5 ml čistého média. Staré médium jsme neodstraňovali. Pátý den byl pokus ukončen. Buňky byly od podkladu uvolněny směsí 0,25% roztoku trypsinu (SIGMA, USA) a 0,02% roztokem EDTA (Výrobna médií ÚMG AV ČR, Praha, ČR) v poměru 1:1. Buňky byly spočítány v Bürkerově komůrce (obr. 1).



Obr. 1. Bürkerova komůrka pod optickým mikroskopem (zvětšeno 100krát).
Fig. 1. Burker chamber under light microscope (magnification 100x).

Po zkouškách in vitro jsme povrch tělísek kontrolovali v elektronovém rastrovacím mikroskopu (SCAN).

Barvení buněk

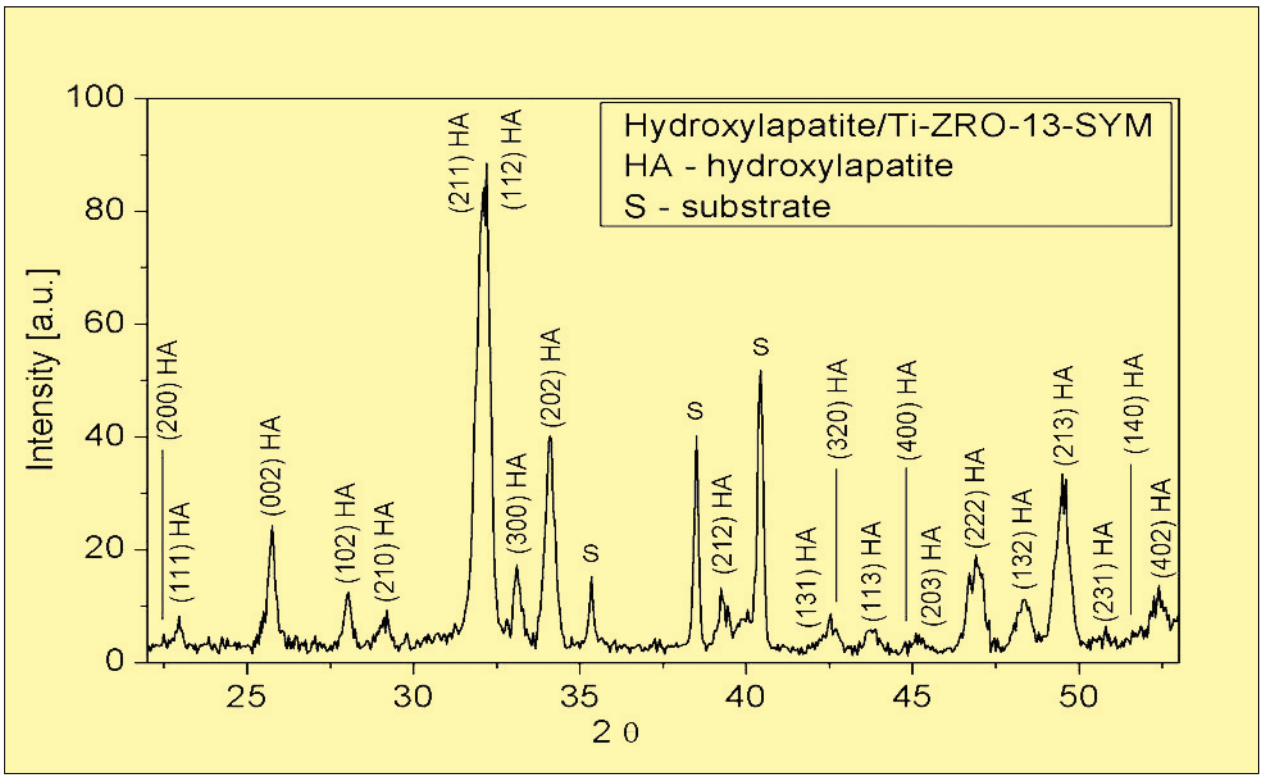
Růst buněk, jejich hustotu i morfologii, jsme v průběhu kultivací kontrolovali mikroskopicky prohlížením v inverzním mikroskopu (Olympus, Praha, ČR). Pro lepší vyhodnocení jsme některé buněčné porosty po ukončení kultivace a fixaci metanolem obarvili činidly May Grünwald a Giemsa Romanovsky.

VÝSLEDKY

Fyzikální analýza provedená testem XRD (graf 1) potvrdila, že se v našem případě opravdu jedná o krystalický hydroxyapatit. Graf zobrazuje jednotlivé roviny krystalické mřížky a hodnoty jsou dále srovnávány se standardy.

Nejlepších výsledků dosahuje kultivace buněk, ať myších nebo lidských, v přítomnosti terčíků z titanu modifikovaných hydroxyapatitem

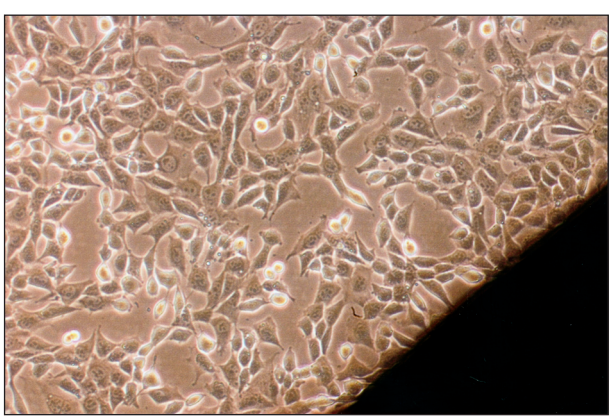
proLékaře.cz | 15.8.2025



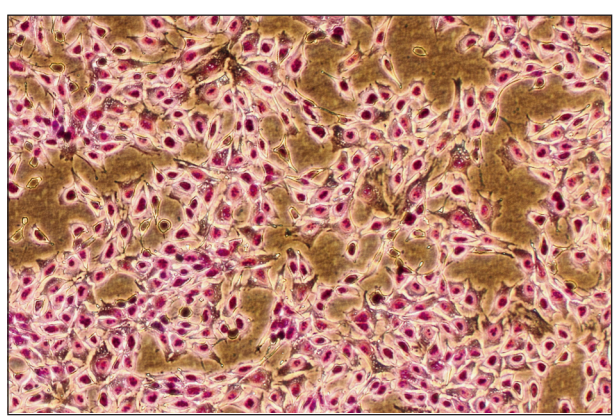
Graf 1. Výsledky fyzikální analýzy provedené testem XRD.
Graph 1. Results of physical analysis performed by the XRD test.

Tab. 1. Výsledky kultivace lidských a myších buněk v přítomnosti terčíků z titanu
Tab. 1. Results of cultivation of human and mouse cell in presence of titanium discs

Materiál	Počet buněk v přítomnosti terče/počet buněk v kontrole %							
	3T3 myší fibroblasty				lidské fibroblasty			
	1. terč	2. terč	3. terč	průměr	1. terč	2. terč	3. terč	průměr
Ti/HA/ZrO_2	81	71	81	78	98	89	95	94
červená pryž	9	9	8	0	0	0	0	
keramika	50	82	63	65	58	74	89	74
pryskyřice	47	28	54	43	30	25	21	25

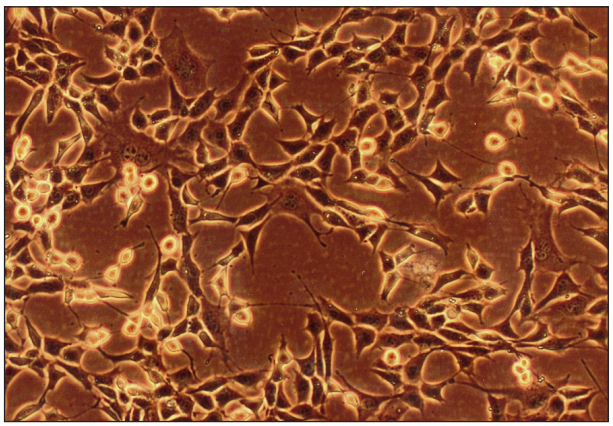


Obr. 2a. 3T3 fibroblasty v okolí povlakovaného terčíku (zvětšeno 100krát).
Fig. 2a. 3T3 fibroblasts in the surroundings of the covered disc (magnification 100x).

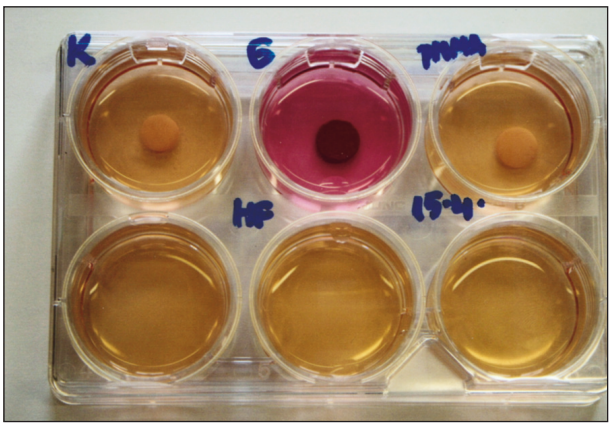


Obr. 2b. LF obarvené na dně jamky (zvětšeno 100krát).
Fig. 2b. LF stained at the bottom of the pit (magnification 100x).

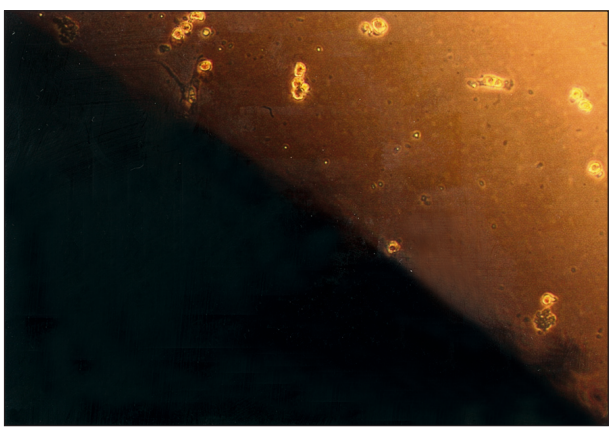
proLékaře.cz | 15.8.2025



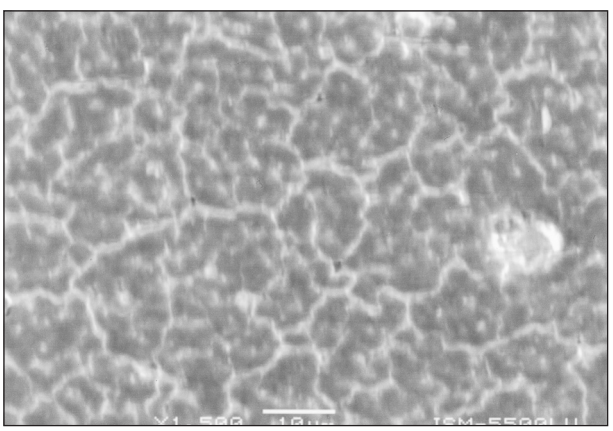
Obr. 3. Vzhled LF v okolí keramického terčíku (zvětšeno 100krát).
Fig. 3. Appearance of LF in the surrounding of the ceramic disc (magnification 100x).



Obr. 5. Barva média v jamkách s různými terčíky (LF).
Fig. 5. The staining of medium in the pit with different discs (LF).



Obr. 4. Odumřelé LF v jamce s terčíkem z červené pryže (zvětšeno 100krát).
Fig. 4. Died LF in the pit with the a red rubber disc (magnification 100x).



Obr. 6. SCAN (zvětšeno 1500krát).
Fig. 6. SCAN (magnification 1500x).

a mezivrstvou zirkonu, podle předpokladů je dalším potenciálně inertním materiálem i keramika. Červená pryž je cytotoxická a z kultivace pryskyřice s nadbytkem monomeru můžeme potvrdit obecně známou skutečnost, že monomer působí cytotoxicky a snižuje počet kultivovaných buněk (tab. 1).

Vycházeli jsme ze situace, kdy buňky byly po 24hodinové kultivaci již adherované a poté k nim byly přidány terčíky. Po vložení terčíků z povlakového titanu (obr. 2a) a keramiky (obr. 3) nedošlo ke změně morfologie kultivovaných buněk, a to ani v bezprostředním okolí vzorků. Fibroblasty i nadále proliferovaly a vytvořily subkonfluentní (obr. 3) až konfluentní (obr. 2a, 2b) porost. U terčíků z červené pryže se adherované buňky nejen nedělily, ale naopak došlo k jejich odvolnění a buňky volně plavaly v médiu (obr. 4).

Růst buněk v přítomnosti jednotlivých terčíků byl potvrzen i makroskopicky změnou barvy kultivačního média. Tam, kde byl velký počet buněk se původně jasně červené médium (indikátor metylénová červeň) změnilo na barvu oranžovou až žlutou. V jamkách, kde jsme kultivovali terčíky z červené pryže a kde bylo velmi málo buněk, médium zůstalo růžové, až načervenalé (obr. 5).

Pozorováním v elektronovém rastrovacím mikroskopu jsme našli hladký, typický pro tyto laserové techniky, povrch s jemnými kapičkami hydroxyapatitu (obr. 6). Povrch po provedených testech je hladký, kresba je nesetřená; laserově deponovaná vrstva zůstává homogenní.

DISKUSE

Prokázali jsme, že terčíky z titanové slitiny povlakované krystalickým hydroxyapatitem s mezivrstvou zirkonu nejsou cytotoxické a lze je využít jako materiálu vhodného pro další zkoumání.

Velmi podobných výsledků jako námi testova-

proLékaře.cz | 15.8.2025

ný materiál dosahují i terčíky z inertní keramiky (tab. 1). Červená pryž je absolutně cytotoxická a uvolňující se monomer u terčíků z pryskyřice snižuje proliferaci buněk a působí na ně také cytotoxicky.

Pozorovali jsme také rozdíly v počtu buněk mezi vzorky pěstovanými s myšími a s lidskými fibroblasty. To je dáno jednak odlišnou reakcí stejných buněk různých živočišných druhů na kultivační prostředí, tak i rozdílným chováním liniových buněk a buněk získaných přímo z tkáně. Jisté rozdíly ve výsledcích mohou být také způsobeny ředěním suspenze malého počtu buněk do relativně velkého objemu kultivačního média.

Pomocí testů in vitro se prokázalo, že sledovaný model titanového implantátu povlečený laserově deponovanou vrstvou hydroxyapatitu s mezivrstvou zirkonu se zdá být perspektivním materiálem vhodným k implantaci. Za velmi důležité považujeme, že daný materiál nejeví známky cytotoxicity; buňky 3T3 a LF v jeho okolí velmi dobře rostou. Tento závěr lze tedy použít jako podklad k dalším pokusům zaměřeným na interakci buněk s tímto materiálem.

Aktuální problém je, jak vylepšit kvalitu nanášeného hydroxyapatitu v tenké vrstvě [3, 5]. Mezi faktory, které mají vliv na kvalitu nanášeného povrchu, patří právě technika ablace. Mezi hlavní parametry výše zmíněného plazma sprayování patří skutečnost, že vrstva takto deponovaná je poměrně silná a víceméně amorfní [6] a hydroxyapatit je porézní, což sice zlepšuje proces oseointegrace [5], ale zároveň zhoršuje kvalitu samotného povrchu a adhezi na vlastní kov implantátu. Většina v dnešní době komerčně vyráběných povlakovaných implantátů je vyráběna právě touto technikou.

Pulzní laserová depozice má s ohledem na podmínky depozice různé výhody – vytváří krystalickou vrstvu, dobře adheruje na kov implantátu a povlak je rovnoměrný [5].

ZÁVĚR

V této studii jsme provedením přímého testu cytotoxicity prokázali, že zkoumané vzorky z titanové slitiny povlečené tenkou vrstvou krystalického hydroxyapatitu s mezivrstvou zirkonu nejsou cytotoxické. Náš výsledek jsme potvrdili pozitivní a negativní zkouškou.

Studie vznikla za podpory Výzkumného záměru MSM 1110006 Stomatologické kliniky 1. LF a VFN. Autoři děkují paní Marii Čápové za technickou asistenci.

LITERATURA

1. **Jonášová, L., Strnad, J.:** Tvorba apatitu na chemicky upraveném titanu (52. sjezd chemických společností, České Budějovice, 17.–20. 9. 2000). Chemické listy, 2000, č. 9, s. 775–778.
2. **Kopecká, D., Šimůnek, A.:** Současné názory na povlakování dentálních implantátů hydroxyapatitem. Čes. Stomat., 2000, č. 1, s. 29–35.
3. **Himmlová, L., Dostálová, T., Jelínek, M.:** Soubor optimálních mechanických vlastností biokeramických povlaků implantátů a jejich parametry pro techniku pulzní laserové depozice. Lék. a tech., 1999, č. 6, s. 126–134.
4. **Jelínek, M., Hnatowicz, V., Kvítek, J., Havránek, V., Dostálová, T., Zergioti, Y., Petrakis, A., Hontzopoulos, E., Fotakis, C.:** Effect of processing parameters on the properties of hydroxyapatite films grown by pulsed laser deposition. Thin Solid Films, 257, 1995, s. 125–129.
5. **Torrisi, L., Trusso, S., Di Marco, G., Parisi, P.:** Pulsed laser deposition of hydroxyaoatite films by KrF Excimer. Physica Medica, 10, 2001, Ź. 4, s. 227–231.
6. **Lacefield, W. R.:** Current status of ceramic coatings for dental implants. Implant Dentistry, 7, 1998, č. 4, s. 315–322.

MUDr. Zuzana Teuberová

Stomatologická klinika 1. LF UK a VFN
Kateřinská 32
121 08 Praha 2