stomatologie_2.07 20.4.2007 7:14 Str. 29
proLékaře.cz | 5.12.2026

II. Titan modifikovaný hydroxyapatitem a zirkonem – biologické vlastnosti

Seydlová M.[1], Teuberová Z.[2], Dostálová T.[1], Dvořáková B.[3], Smetana K. Jr.[3], Jelínek M.[4], Mašínová P.[4], Kocourek T.[4], Kolářová K.[5], Wilson J.[6]

[1]Dětská stomatologická klinika 2. LF UK a FN Motol, Praha
[2]Protetické oddělení, Stomatologická klinika 1. LF UK a VFN, Praha
[3]Anatomický ústav 1. LF UK, Praha
[4]Fyzikální ústav AV ČR, Praha
[5]Ústav chemických technologií VŠCHT, Praha
[6]Fakulta nukleárních věd a fyzikálního inženýrství, Česká technická univerzita, Praha

Souhrn

Jedním z moderních trendů implantologie jsou povlakované implantáty, které byly předmětem našeho zkoumání.

Po podrobných technických zkouškách tří různých typů vzorků - titanové slitiny $TiAl_6V_4$, titanové slitiny povlečené zirkonem a titanové slitiny povlečené hydroxyapatitem s mezivrstvou zirkonu, jsme testovali proliferaci a metabolickou aktivitu lidských embryonálních plicních fibroblastů v okolí vzorků. V Bůrkrově komůrce jsme počítali sklizené buňky a provedli MTT test. Zjistili jsme, že žádný vzorek nebyl cytotoxický a povrch vzorků umožňuje buněčnou kolonizaci.

Pulzní laserová depozice se jeví jako slibná metoda v oblasti povlakování implantátů na kovové jádro a biologické testy předpokládají, že povlak z krystalického hydroxyapatitu může zlepšit biologické vlastnosti titanu povlečeného hydroxyapatitem s mezivrstvou zirkonu.

Klíčová slova: dentální implantát – laserová ablace – krystalinita – buněčná proliferace – MTT test

Seydlová M., Teuberová Z., Dostálová T., Dvořáková B., Smetana K. Jr., Jelínek M., Mašínová P., Kocourek T., Kolářová K., Wilson J.:
II. Titanium Modified with Hydroxyapatite and Zirconium – Biological Properties

Summary: Coated implants representing one of modern trends in implantology have been the subject of our investigation.

After detailed technical tests of three different types of samples – titanium alloy $TiAl_6V_4$, titanium alloy covered with zirconium and titanium alloy covered with hydroxyapatite with a zirconium interlayer, the authors tested proliferation and metabolic activity of human embryonic lung fibroblasts in the neighborhood of the samples. In the Burker chamber the authors calculated the harvested cells and performed the MTT test. It has become obvious that the sample was not cytotoxic and the surface of the samples made cellular colonization possible.

Pulse laser deposition appears to be a promising method in the area of coating the implants on the metal core and biological tests indicate that the coating from crystalline hydroxyapatite may improve biological properties of titanium coated with hydroxyapatite with an interlayer of zirconium.

Key words: dental implant – laser ablation – crystalline structure – cellular proliferation – MTT test

Čes. Stomat., roč. 107, 2007, č. 2, s. 29–31.

ÚVOD

Klasický Brånemarkův protokol zavádění implantátů sice dává dobře předvídatelné výsledky, ale je vždy dvoufázový, což samozřejmě prodlužuje dobu ošetření. Jednofázové ošetření a okamžité či časné zatížení procházejí velkým vývojem, jelikož je všeobecná snaha, aby bylo ošetření pro pacienta lépe akceptovatelné [1].

Povrch dentálního implantátu může výrazně ovlivňuje adhezi buněk a jejich proliferaci, a tím pádem následně i osteointagraci implantátu. Samozřejmostí je, že předpokládáme bezchybnou a šetrnou inserci implantátu do kosti. Faktory, které ovlivňují vlastnosti povrchu implantátu, jsou velmi intenzivně zkoumány a patří mezi ně například: typ použitého titanu, způsob čištění povrchu implantátu před depozicí povlaku,

stomatologie_2.07 20.4.2007 7:14 Str. 30
proLékaře.cz | 5.12.2026

samotná struktura povlaku ve smyslu chemického složení, hrubosti, sterilizační technika anebo krystalinita samotného hydroxyapatitu [2].

V dřívějších studiích bylo prokázáno, že je-li kovový materiál povlečen tenkou vrstvou HA, je prokazatelný nárůst kosti. Tento efekt je největší ve 2.–4. týdnu, ale vymizí okolo 12. týdnu [3]. Fenomén rychlejší osteointegrace nám dovoluje dosáhnout možného terapeutického efektu vzhledem k rychlejší rehabilitaci pacientů s implantáty povlakovanými HA.

Hydroxyapatit (HA) patří mezi bioaktivní keramické materiály, tzn. materiály, které vážou okolní kostní tkáň a umožňují formování nové kosti [3], projevují se tak jeho významné osteokondukční vlastnosti. Tato schopnost je unikátní pro bioaktivní keramiku. Jeho nevýhodou je přílišná křehkost, a tak se využívá k povlakování implantátů různými technikami.

Existuje několik technik, které se používají k povlakování dentálních implantátů, nejčastěji se v literatuře zmiňuje pulzní laserová depozice, dále i magnetronové naprašování, vakuové depoziční techniky, elektroforéza aj. [4]. Pulzní laserová depozice je jednou z vakuových depozičních metod, která se objevila na počátku 90. let 20. století. Vytváří pomocí KrF nebo ArF laseru v ochranné atmosféře argonu a vodních par tenké povlaky, které dosahují maxima 1 Ķm, vykazují vysokou adhezi k substrátu, zaručuje povlaky bez dalších chemických přísad a nečistot, lze je aplikovat na velmi složité tvary, tedy i na šroubové implantáty, a dobře se kontroluje Ca/P poměr iontů v HA povlaku. Limitací metody je snad jen její omezení na menší plochy, což u implantátů nevadí. Depoziční podmínky se nastavují podle požadavků výsledného povlaku, a tak lze vytvořit amorfní i krystalické povlaky HA [4].

Technické parametry vzorků jsme potvrdili podrobnými zkouškami v předchozí studii (viz Technické vlastnosti).

V naší práci jsme testovali povrch rozdílných terčů z hlediska jejich biologických vlastností. Provedli jsme test kolonizace, poté test proliferace a metabolické aktivity pomocí MTT testu lidských embryonálních plicních fibroblastů. Již dříve jsme verifikovali, že zkoumané vzorky nejsou cytotoxické [5].

MATERIÁL A METODY

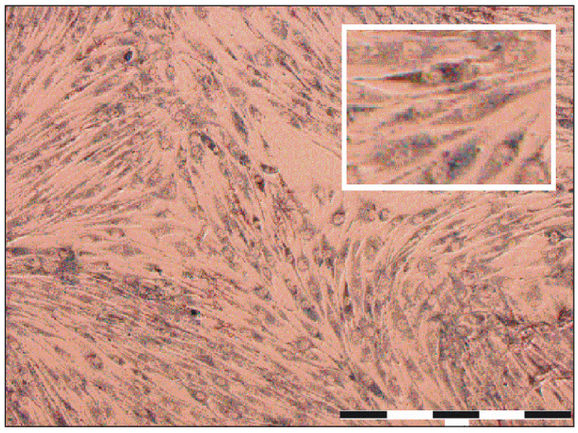
K biologickým testům jsme použili buněčnou linii lidských embryonálních plicních fibroblastů (LEP_{19}) (Sevapharma, Česká republika). Buněčnou proliferaci na povrchu vzorků jsme potvrdili počítáním buněk v Bürkrově komůrce a pomocí MTT testu. Testovali jsme tři typy vzorků (každý o průměru cca 10 mm a výšce 2 mm): titanovou slitinu $TiAl_6V_4$, titanovou slitinu povlečenou zirkonem a titanovou slitinu povlečenou hydroxyapatitem s mezivrstvou zirkonu. Sterilní vzorky jsme umístili do 24jamkové desky (NUNC, Roskilde, Dánsko). Do každé jamky jsme nasadili fibroblasty o hustotě 22 000 buněk/cm², a to v celkovém objemu 1 ml kultivačního média (EPL - Sevapharma, Česká republika). Každý vzorek měl svoji kontrolu – tkáňově upravený polystyren bez přítomnosti jakéhokoliv vzorku. Kultivace probíhala po 120 hod při teplotě 37 °C, 5% CO_2 a 100% vlhkosti. Po 48 hodinách bylo médium vyměněno. Pátý den jsme buňky z povrchu vzorků sklidili pomocí 0,15% trypsinu (SIGMA, Praha, Česká republika). Fibroblasty jsme počítali v Bürkrově komůrce pomocí optického mikroskopu (Nikon, Japonsko). Metabolickou aktivitu jsme prokázali pomocí MTT testu [6]. Odstranili jsme kultivační médium a do každé jamky jsme přidali 1 ml 2 mM roztoku thiazolové modři (3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromid - SIGMA, Praha, Česká republika) v bezsérovém médiu H-MEM (Výrobna médií ÚMG ČSAV, Praha, ČR). Buňky jsme takto ponechali v inkubátoru 2 hodiny při 37 °C a 5% CO_2. Poté jsme vzorky přenesli do nových jamek a vytvořený modrý precipitát jsme rozpustili v 1,2 ml isopropylalkoholu. V kontrolních jamkách jsme odstranili roztok MTT a přidali stejný objem isopropylalkoholu. Pomocí přístroje EL 800 Universal Microplate Reader (Biotek instruments, INC Highland Park, USA) při vlnové délce 570 nm jsme proměřili absorbanci vytvořeného modrého precipitátu. Výsledky jsme statisticky zpracovali pomocí Studentova t-testu v hladině pravděpodobnosti 0,05.

VÝSLEDKY A DISKUSE

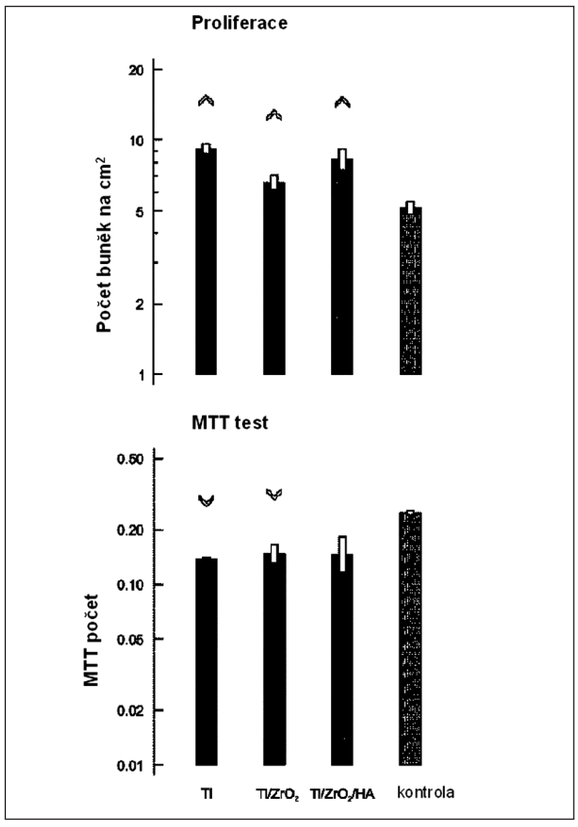
Hydroxyapatit se rozpouští v těle, jestliže je v kyselém, tedy zánětlivém prostředí, a pokud má nízkou krystalinitu. To znamená, že amorfní HA má nízkou biokompatibilitu [7]. Často je diskutován vliv poměru krystalické a amorfní HA fáze na biologické vlastnosti povlaku u rozdílných typů implantátů [8]. Poměr těchto fází je závislý jednak na teplotě, jednak na tlaku při depozici povlaku [9].

Námi použité fibroblasty byly schopné růst v přítomnosti testovaných vzorků. Morfologie i proliferační schopnost byla srovnatelná s kontrolním povrchem tkáňově upraveného polystyrenu (obr. 1). Žádný z testovaných materiálů nebyl cytotoxický a umožňoval růst buněk. Buňky adherovaly k povrchu vzorků, proliferovaly a tvořily uniformní kolonie. Počet vykultivovaných buněk vyrostlých na povrchu zkoumaných vzorků byl statisticky vyšší než na kontrolním povrchu. (obr. 2). Na druhé straně jsme zjistili vyšší metabolickou aktivitu na tkáňově upraveném polystyrenu, který je brán jako optimální materiál ke kultivaci

stomatologie_2.07 20.4.2007 7:14 Str. 31
proLékaře.cz | 5.12.2026



Obr. 1. MTT test - lidské embryonální plicní fibroblasty LEP 19) v optickém mikroskopu.



Obr. 2. A)-výsledky testu proliferace po statistickém zpracování dat; B)-výsledky MTT testu po statistickém zpracování dat.
Legenda: Ti – titanová slitina, Ti/ZrO2 – titanová slitina s vrstvou zirkonu, Ti/ZrO2/HA – titanová slitina s mezivrstvou zirkonu a povlakem z hydroxyapatitu

buněk (obr. 2). Největší metabolické aktivity jsme však dosáhli u vzorků povlečených HA s mezivrstvou zirkonu, ačkoli absolutní počet buněk byl nižší. Vyšší metabolická aktivita buněk na sendvičově uspořádaném vzorku by mohla předpokládat i větší tvorbu extracelulární matrix.

Fibroblasty, jakožto osteoblastům podobné buňky, jsme použili z toho důvodu, že vykazují obdobné chování jako osteoblasty [2], jak bylo prokázáno v mnoha studiích.

ZÁVĚR

Potvrdili jsme, že titanová slitina povlečená hydroxyapatitem s mezivrstvou zirkonu umožňuje růst fibroblastů, a je tedy vhodným materiálem pro další výzkum v oblasti dentálních implantátů. Shledali jsme, že tento materiál není cytotoxický a podporuje oxidativní metabolismus buněk.

Poděkování
Autoři chtějí poděkovat L. Mrklasovi za statistické zpracování dat. Tato práce vznikla za podpory Grantové agentury IGA MZ ČR, grant 8512-3.

LITERATURA

1. **Chow, J., Hui, E., Li, D., Liu, J.:** Immediate loading of BrĆnemark System Fixtures in the mandibule with a fixed provisional prosthesis. Applied Osseointegration Research, 2, 2001, č. 1, s. 366.
2. **Lumbikanonda, N., Sammons, R.:** Bone cell attachement to dental implants of different surface characteristics. The International Journal of Oral and Maxillofacial Implants, 16, 2001, 16, č. 5, s. 627-636.
3. **Ducheyne, P., Qui, Q.:** Bioactive ceramics: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function. Biomaterials, 20, 1999, s. 2287-2303.
4. **Seydlova, M., Teuberova, Z., Dostalova, T., Dvorankova, B., Smetana, K. Jr., Jelinek, M., Kocourek, T., Mroz, W.:** Biological properties of titanium implants covered with hydroxyapatite and zirconia layers by pulsed laser: In vitro study, J. Appl. Phys., 2006, 9:014905.
5. **Kirkpatrick, C. J., Dekker, A.:** Quantitative evaluation of cell interaction with biomaterials in vitro. Biomaterials – Tissue Interfaces. Eds. Doherty, P. J., Williams, R. L., Williams, D. F., Lee, A. C. J. Elsevier, 1992, s. 31-41.
6. **Nakayama, T., Tanaka, T., Tsumoto, Y., Katayama, H., Katto, M.:** High-quality hydroxyapatite coating on biocompatible materials by laser-assisted laser ablation metod. Appl. Phys., A, 79, 2004., s. 833-836.
7. **Dostalova, T., Jelinek, M., Himmlova, L., Pesakova, V., Adam, M.:** Physical and biological evaluation of hydroxyapatite on Ti6Al4V substrates by excimer laser ablation. Cell Mater, 1996, 6, s. 117-126.
8. **Blind, O., Klein, L. H., Dailez, B., Jordan, L.:** Characterisation of hydroxyapatite films obtained by pulsed-laser deposition on Ti and Ti-6Al-4V substrates. Dental Mater, 2005, s. 1-8.
9. **Mihailescu, I. N., Jelinek, M., Nelea, V.:** Pulsed laser deposition of thin films. applications – led growth of functional materials. Chapter 18, 2006, s. 421-459, John Wiley and Sons, Inc. v tisku.

MUDr. Michaela Seydlová
Dětská stomatologická klinika
2. LF UK a FNM
V Úvalu 84
150 06 Praha 5-Motol