



Testování biomateriálů – cytotoxicita

Ing. Roman Matějka, Ing. Jana Štěpanovská

Materiál přicházející do kontaktu s lidským organismem (biomateriál) musí být testován na mnohé vlastnosti. Prvotně se charakterizují fyzikální a chemické vlastnosti biomateriálu, které ovlivňují např. buněčnou adhezi či smáčivost povrchu. Nesmírně podstatou částí vývoje biomateriálu je kontrola jeho biokompatibility - interakce s hostitelem a cytotoxicita materiálu. Ověření biokompatibility materiálu je nezbytné, ať má sloužit pro budoucí aplikaci jako pomocný materiál (hadičky, stříkačky), dočasný materiál (fixátory zlomenin, šicí materiál, kosmetické přípravky), či dlouhodobý implantát (umělé cévy, kloubní náhrady).

Interakce biomateriálu s organismem mohou být různé: bio-inertní (zirkoničitá keramika), bio-aktivní (hydroxyapatit) nebo resorbovatelné (polymery na bázi kyseliny polymléčné). Ve všech případech se ale nesmí jednat o materiál toxický, který by uvolňoval látky, přímo nebo nepřímo zabíjející buňky, či který by pozměnil buněčný fenotyp. Testování cytotoxicity probíhá primárně in vitro testy - na buněčných kulturách. Je nutné zjistit, zda biomateriál nebude přímo či nepřímo ovlivňovat buněčnou morfologii, apoptózu/nerózu, metabolickou aktivitu, buněčné dělení apod.

Řada materiálů, resp. biomateriálů vyžaduje při jejich přípravě použití látek jež jsou samy o sobě vysoce toxické. Tyto látky jsou však použity pouze jako pomocné pro proces a před použitím takového materiálu je nutné jejich dokonalé vymytí. I relativně malé množství (reziduum) může způsobit toxické účiny na buněčné úrovni. Příkladem je to např. SDS nebo enzymy při decelularizaci tkání, vysoce těkavá rozpouštědla jako je např. chloroform pro přípravu nanovláken apod.

Existují tři základní postupy, které se využívají pro určení biokompatibility. Zkouška přímým kontaktem, kdy se testovaný materiál vloží přímo do buněčné kultury. Zkouška nepřímým kontaktem, kdy se buněčná kultura nejprve překryje např. agarovým gelem a následně se materiál umístí na takto zpevněný povrch. Třetí a nejcitlivější zkouškou je tvorba extraktu (eluční test). U tohoto typu testu se nejprve do příslušného pufru (media) vloží testovaný materiál a tento pufr se následně přidá k buněčné kultuře.

Při návrhu in vitro testů a volbě metody testování cytotoxicity je důležité zvážit množství a délka expoziční dávky, budoucí umístění a způsob použití biomateriálu, možnost metabolické přeměny látky na toxický produkt např. jaterními buňkami. Souhrnně se musí posoudit, zda in vitro testy budou alespoň částečně odpovídat in vivo prostředí. Poté, co vystavíme buněčnou kulturu testovanému biomateriálu, existuje mnoho parametrů, které se využívají na měření cytotoxicity. Jako příklady si uvedeme pozorování morfologie, stanovení počtu buněk a metabolickou aktivitu.

Morfologie

V průběhu testování je možné přímo pozorovat změny tvaru buněk pomocí invertovaného mikroskopu s fázovým kontrastem. Změny je také možné přímo pozorovat na časosběrných videích tzv. live cell imaging. Pro pozorování vnitřních struktur je vhodná fluorescenční/konfokální mikroskopie. Pomocí specifických fluorescenčně značených protilátek je možné obarvit jednotlivé struktury organel, cytoskeletu či samotné proteiny.

Počet buněk

Pro kvantifikaci buněk se využívá mnoho přístupů v závislosti na možnostech dané laboratoře. Nejsnazší, běžně užívaná metoda pro určení celkového počtu živých/mrtvých buněk je počítání pomocí hemocytometru, či přístroji pro automatické počítání buněk. Na odlišení mrtvých buněk se využívá barvení např. trypanovou modří, která proniká přes permeabilizovanou membránu mrtvých buněk. Další metodou je průtoková cytometrie, která pomocí fluorescenčního značení odlišuje živé/mrtvé buňky. Výhodou této metody je možnost stanovení množství buněk v různých fázích buněčného cyklu ($G_1/S/G_2/M/G_0$ fáze) a obarvení specifických membránových proteinů. Mezi další metody patří

Biomedicínské inženýrství pro znalostní ekonomiku,

CZ.02.2.69/0.0/0.0/16_018/0002242

Modernizace laboratoří pro biomedicínské inženýrství,

CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_017/0002244



EVROPSKÁ UNIE
Evropské strukturální a investiční fondy
Operační program Výzkum, vývoj a vzdělávání



Testování biomateriálů – cytotoxicita

Ing. Roman Matějka, Ing. Jana Štěpanovská

LIVE/DEAD eseje, které odlišují živé a mrtvé buňky dle enzymatické aktivity živých buněk. Pro kvantifikaci se také používá srovnání celkového množství proteinů nebo DNA. Proteiny či DNA se separují z buněčného lyzátu a následně se množství vizualizuje pomocí elektroforézy nebo PCR (polymerázová řetězová reakce).

Metabolická aktivita

Na stanovení metabolické aktivity buněk se využívá celá řada metod zaměřených na enzymy živých buněk. Často se jedná o kolorimetrické eseje (např. MTT, XTT), kdy metabolicky aktivní buňky přeměňují svými enzymy substrát na metabolit měřitelný při dané vlnové délce.

Zadání:

Otestovat cytotoxicitu připravených nanovlákných nosičů elučním testem s cílem pozorovat změny v morfologii buněk pomocí světelné a fluorescenční mikroskopie.

Přístroje:

- Systém na přípravu nanovláken
- Laminární box
- CO2 inkubátor
- Invertovaný mikroskop s fázovým kontrastem a fluorescencí
- Zařízení na přípravu ultračisté vody
- Centrifuga
- pH-meter
- Analytické váhy

Další pomůcky:

- Kultivační medium
- Buněčná kultura - nasazená na šesti jamkové kultivační desce (24-well) v cca 60% konfluenci
- Sterilní nádoba pro přípravu eluátu
- Fixační činidlo na buňky (70% etanol / 4%paraformaldehyd)
- Fluorescenční barva na aktin (fluorescenčně značený phalloidin)
- Fluorescenční barva na jádra (DAPI/hoechst)
- 10% roztok Tritonu X-100 v qH₂O
- Sterilní qH₂O
- Sterilní PBS
- Sterilní pinzeta

Příprava nanovlákných nosičů

Příprava polymeru

1. Navažte a odměřte látky potřebné pro přípravu polymeru pro zvláknění – pracujte v digestoři, a použijte skleněné nádoby
 - a. PCL granulát – celkový podíl bude 9% hmotnostně
 - b. Rozpouštědlo roztok chloroformu, etanolu a kys. Octové v poměru 8:1:1

Testování biomateriálů – cytotoxicita

Ing. Roman Matějka, Ing. Jana Štěpanovská

2. Připravený roztok polymeru dejte rozvolnit do třepačky

Příprava plošného nanovlákněného nosiče pomocí bezjehlového emitoru

1. Doplňte polymer do 5 ml stříkačky
2. Připravte systém pro vláknění – základní nastavení
 - a. Připravte dvoukanálový emitor pro bezjehlové zvláknění
 - b. Připravte kolektor typu plošná deska a umístěte na jeho povrch vrstvu sterilní netkanné textily
 - c. Vložte kolektor i emitor do depoziční komory, připojte k dávkovači polymeru
3. Nastavte depoziční parametry
 - a. Depoziční vzdálenost 15 cm
 - b. Nastavte základní napětí 35 kV
 - c. Dávkovaný objem nastavte na 100 ul/min
 - d. V komoře nastavte proudění vzduchu na 10 l/min
4. Spusťte vláknicí proces
 - a. Postupně zvyšujte depoziční napětí dokud nedojde ke vzniku vláknicí trysky, cca. 40 – 50 kV dle stupně rozvolnění polymeru
 - b. V případě, že dochází k rychlému zvláknění kapky na jehle, zvýšte dávkovaný objem na ca. 120-140 ul
5. Deponujte po dobu 15 minut
6. Po ukončení depozice vyjměte kolektor s připravenými vlákny, pomocí skalpelu tyto vlákna odřízněte podélně a poté rozdělte na čtverce 10 x 10 mm a nechte po dobu 30 min sterilizovat pod UV zářením, nebo propláchněte.
7. Sterilní vlákna dále zpracujte podle protokolu pro testování cytotoxicity.

Příprava trojrozměrného nanovlákněného nosiče pomocí bezjehlového emitoru

1. Doplňte polymer do 5 ml stříkačky
2. Připravte systém pro vláknění – základní nastavení
 - a. Připravte dvoukanálový emitor pro bezjehlové zvláknění
 - b. Připravte kolektor typu drátěná deska
 - c. Vložte kolektor i emitor do depoziční komory, připojte k dávkovači polymeru
3. Nastavte depoziční parametry
 - a. Depoziční vzdálenost 15 cm
 - b. Nastavte základní napětí 40 kV
 - c. Dávkovaný objem nastavte na 100 ul/min
 - d. V komoře nastavte proudění vzduchu na 10 l/min
4. Spusťte vláknicí proces
 - a. Postupně zvyšujte depoziční napětí dokud nedojde ke vzniku vláknicí trysky, cca. 45 – 50 kV dle stupně rozvolnění polymeru
 - b. V případě, že dochází k rychlému zvláknění kapky na jehle, zvýšte dávkovaný objem na ca. 120-140 ul
5. Deponujte po dobu 15 minut
6. Po ukončení depozice vyjměte kolektor s připravenými vlákny, pomocí sběrače tyto vlákna odeberte. Vždy odeberte celou řadu, poté sběrač otočte o 90° a odeberte další řadu, tak aby

Testování biomateriálů – cytotoxicita

Ing. Roman Matějka, Ing. Jana Štěpanovská

došlo k vrstvení do formy 3D konstrukt. Přípravný konstrukt rozdělte na čtverce 10 x 10 mm a nechte po dobu 30 min sterilizovat pod UV zářením, nebo propláchněte.

7. Sterilní vlákna dále zpracujte podle protokolu pro testování cytotoxicity.

Příprava extraktu z nanonosičů

Materiál pro testování cytotoxicity je nutné nejprve vysterilizovat v závislosti na vlastnostech materiálu. V případě nanovláken je nejvhodnější UV sterilizace příp. ethanol.

1. 1/2 vzorků pouze sterilizujeme pomocí UV
2. 2/2 polovinu vzorků před sterilizací 5x propláchneme pomocí dH₂O a PBS v třepačce, vždy po dobu 10 min, cílem je vymytí zbylých reziduí rozpouštědel

Do sterilních nádob obsahujících 6 ml kultivačního media v laminárním flow boxu vložte sterilní testovaný materiál a v inkubačním boxu při 37°C nechte extrahovat látky do media po dobu alespoň 24h.



Obrázek 1 Příprava extraktu pro testování cytotoxicity

- A. Kultivace buněk s toxickým materiálem

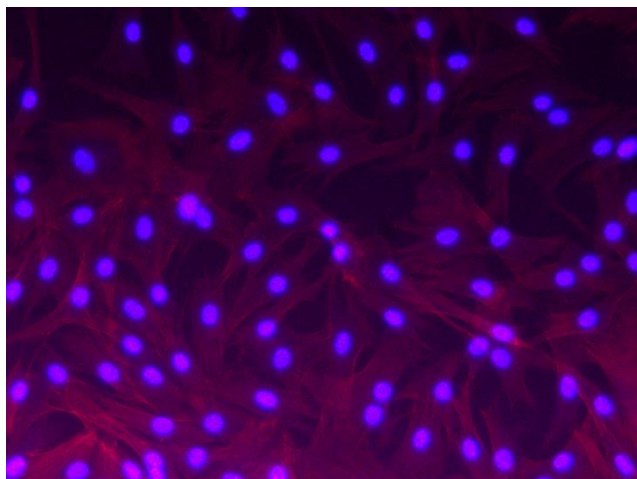
V předem připravené kultivační desce (6-well) s buňkami vyměňte v příslušných jamkách kultivační medium za medium, které bylo alespoň 24h v kontaktu s testovaným biomateriálem. Do dalších příslušných jamek vložte testovaný materiál napřímo. Nechejte v inkubačním boxu přes noc.

Fixace a fluorescenční barvení

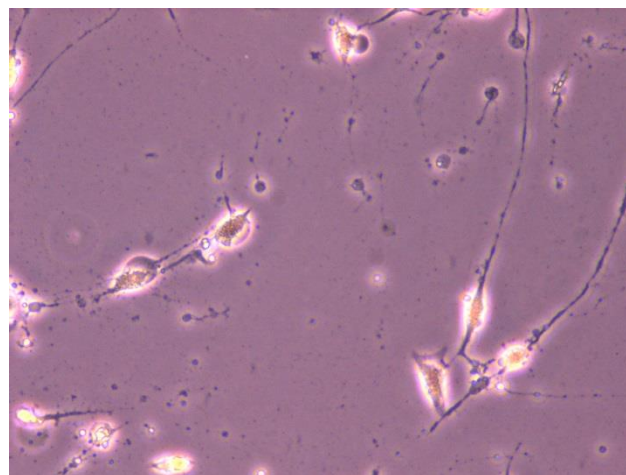
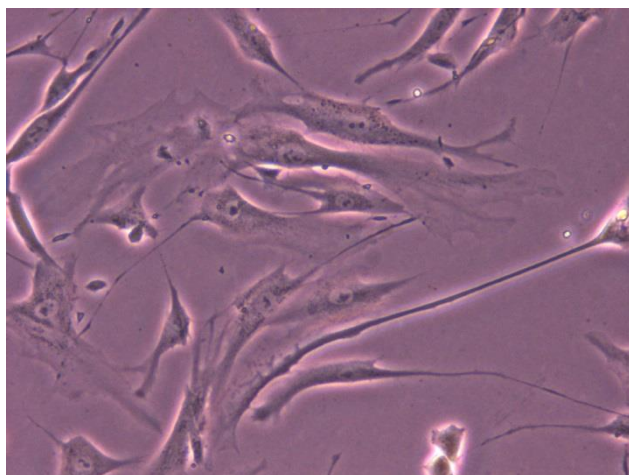
1. Odeberte veškeré kultivační medium a buňky jemně opláchněte 3 ml PBS
2. Přidejte 3 ml fixačního činidla na 15min
3. Odsajte fixační činidlo a buňky jemně opláchněte 3 ml PBS
4. V případě fixací paraformaldehydem je nutné buňky permeabilizovat 0,1% Tritonem - 10 min v 3 ml PBS
5. Přidejte fluorescenční barvu na aktin a buněčná jádra ředěné v 3 ml PBS na 30min ve tmě
6. Opláchněte alespoň 2x v 3 ml PBS
7. Pozorování na fluorescenčním mikroskopu

Testování biomateriálů – cytotoxicita

Ing. Roman Matějka, Ing. Jana Štěpanovská



Obrázek 2 Buňky ASC - Fluorescenčně značený aktin - červený a modře značená jádra



Obrázek 3 Buňky ASC - pozorování morfologie. Kontrolní rostoucí linie vlevo a vpravo buňky kultivované s olověným drátem přes noc.