Uniwersytet Jagielloński

Wydział Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej

Zakład Fizyki Nanostruktur i Nanomateriałów

Charakteryzacja nanostruktur biologicznych przy pomocy mikroskopii sił atomowych i mikroskopii optycznej

Grzegorz Brzezinka

PRACA MAGISTERSKA wykonana pod kierunkiem prof. dr. hab. Marka Szymońskiego

Kraków 2010

Serdecznie dziękuję wszystkim osobom, które przyczyniły się do powstania mojej pracy magisterskiej.

Promotorowi profesorowi Markowi Szymońskiemu dziękuję za wartościową opiekę naukową i zapewnienie wszelkich niezbędnych środków umożliwiających swobodną realizację rozwijającej pracy.

Podziękowania kieruję również do pracowników Zakładu Fizyki Nanostruktur i Nanotechnologii, szczególnie do dr hab. Piotra Cyganika i dr Janusza Budziocha, za cenne wskazówki, rady i poświęcony czas.

Nieocenioną motywację do pracy stanowiła dla mnie Rodzina i Narzeczona, którym to jestem bardzo wdzięczny za mobilizujące wsparcie, cierpliwość i końcową korektę. To im właśnie, którzy zawsze wspierają mnie w dążeniu do celu, dedykuję tę pracę.

Spis treści

Ι	W	stęp		7
п	V	Vprow	vadzenie	8
1.	Bior	nateria	ły	8
	1.1.	Ogólna	a charakterystyka	8
	1.2.	Implan	ty biostatyczne i biomechaniczne	8
	1.3.	Badani	ie biozgodności materiału	9
		1.3.1.	Dobór komórek do badań pozaustrojowych	9
2.	Fibr	oblasty		10
	2.1.	Rola i	funkcje w organiźmie	10
	2.2.	Hodow	la in vitro	11
		2.2.1.	Krzywa wzrostu komórek w hodowli	12
3.	Lab	oratoriı	ım hodowli komórkowych	13
4.	Tec	hniki po	omiarowe	13
	4.1.	Mikros	kopia optyczna	13
		4.1.1.	Mikroskop optyczny	13
		4.1.2.	Mikroskop fluorescencyjny	14
		4.1.3.	Mikroskop konfokalny	14
		4.1.4.	Mikroskop skaningowy bliskiego pola	14
		4.1.5.	Spektroskopia bliskiego pola	15
	4.2.	Mikros	kopia Sił Atomowych	15
		4.2.1.	Budowa	15
		4.2.2.	Zasada działania	16
		4.2.3.	Wykorzystanie w pomiarach biologicznych na wybranych przykła-	
			dach	17
			4.2.3.1. Obrazowanie in sitiu żywych struktur	17
			4.2.3.2. Badanie elastyczności błon biologicznych	21
			4.2.3.3. Badanie adhezji i oddziaływań międzymolekularnych	22
			4.2.3.4. Chemiczna analiza nanostruktur biologicznych	22

4.3. Hemocytometria	23
4.3.1. Komora Bürkera	23
4.3.1.1. Przygotowanie roztworu	23
4.3.1.2. Przygotowanie komory	24
4.3.1.3. Zliczanie komórek	24
4.3.1.4. Oszacowanie liczby komórek	24
III Charakterystyka badanych powierzchni	26
1. Pochodzenie i ogólna charakterystyka próbek	26
1.1. Próbka platyny	26
2. Właściwości fizyczne stopów tytanu	27
3. Wielkości opisujące chropowatość powierzchni	28
4. Przygotowanie próbek	29
5. Jakościowa ocena pod mikroskopem optycznym	30
5.1. Wykorzystane przyrządy	30
5.2. Analiza uzyskanych obrazów	31
6. Kąt zwilżania	31
6.1. Podstawy fizyczne	31
6.2. Metoda pomiaru	35
6.3. Wyniki	36
7. Badanie topografii przy użyciu AFM	37
7.1. Metoda pomiarowa	37
7.2. Skala $50 imes 50\ \mu m^2$	37
7.3. Skala $5 imes 5 \ \mu m^2$	38
8. Zestawienie wyników pomiarów ilościowych	39
IV Hodowla fibroblastów na badanych powiorzebniach	∕ 19
	4
1. Zależność liczebności komórek od czasu inkubacji	42

	1.1.	Metodyka pracy	42		
	1.2.	Badanie liczebności komórek na powierzchni	42		
	1.3.	Wyznaczenie pola powierzchni próbek	43		
		1.3.1. Metoda wyznaczania pola powierzchni	43		
		1.3.2. Szacowanie niepewności	45		
		1.3.3. Wyniki	46		
	1.4.	Wyniki	47		
	1.5.	Obserwacje	47		
2.	Obs	erwacja pod mikroskopem optycznym	48		
3.	Obrazowanie Mikroskopem Sił Atomowych 5				
	3.1.	Metoda badawcza	50		
		3.1.1. Unieruchomienie komórek	50		
	3.2.	Obrazy fibroblastów	50		
	3.3.	Obserwacje	54		
\mathbf{V}	Ρ	odsumowanie	56		
•					
1.	Inte	rpretacja wyników i wnioski	56		
1.	Inte 1.1.	rpretacja wyników i wnioski Analiza niepewności	56 56		
1.	Inte 1.1. 1.2.	rpretacja wyników i wnioski Analiza niepewności	56 56 56		
1.	Inte 1.1. 1.2. 1.3.	rpretacja wyników i wnioski Analiza niepewności	56 56 56 57		
1. 2.	Inte 1.1. 1.2. 1.3. Stre	rpretacja wyników i wnioski Analiza niepewności Analiza statystyczna Wnioski Szczenie pracy	56 56 57 59		
1. 2. Lit	Inte 1.1. 1.2. 1.3. Stre	rpretacja wyników i wnioski Analiza niepewności	 56 56 56 57 59 61 		
1. 2. Lit Sp	Inte 1.1. 1.2. 1.3. Stre ceratu	rpretacja wyników i wnioski Analiza niepewności	 56 56 56 57 59 61 66 		
1. 2. Lii Sp Sp	Inte 1.1. 1.2. 1.3. Stre ceratu is rys is tal	rpretacja wyników i wnioski Analiza niepewności	 56 56 57 59 61 66 67 		
1. 2. Lit Sp Za	Inte 1.1. 1.2. 1.3. Stre ceratu is rys is tal lataczr	rpretacja wyników i wnioski Analiza niepewności	 56 56 57 59 61 66 67 68 		
1. 2. Lit Sp Za A.	Inte 1.1. 1.2. 1.3. Stre ceratu is rys is tal lataczr Top	rpretacja wyników i wnioski Analiza niepewności	 56 56 57 59 61 66 67 68 69 		
1. 2. Lit Sp Za A.	Inte 1.1. 1.2. 1.3. Stre ceratu is rys is tal lager lager A.1.	rpretacja wyników i wnioski Analiza niepewności	 56 56 57 59 61 66 67 68 69 69 		
1. 2. Lii Sp Za A.	Inte 1.1. 1.2. 1.3. Stre ceratu is rys is tal daczr Top A.1. A.2.	rpretacja wyników i wnioski Analiza niepewności Analiza statystyczna Analiza statystyczna Wnioski Wnioski szczenie pracy ura sunków blic niki ografia badanych powierzchni Skala $50 \times 50 \ \mu m^2$ Skala $5 \times 5 \ \mu m^2$	 56 56 57 59 61 66 67 68 69 73 		

B.1.	Wypos	ażenie pracowni hodowli komórek
	B.1.1.	Sprzęt
		B.1.1.1. Komora laminarna
		B.1.1.2. Inkubator CO_2
		B.1.1.3. Wirówka
		B.1.1.4. Mikroskop
		B.1.1.5. Chłodziarka i zamrażarka
		B.1.1.6. Mieszadło magnetyczne, vortex
		B.1.1.7. Myjka ultradźwiękowa
		B.1.1.8. Łaźnia wodna
		B.1.1.9. Lampa UV
	B.1.2.	Odczynniki i roztwory
		B.1.2.1. Pożywka DMEM
		B.1.2.2. Surowica
		B.1.2.3. Podłoże do zamrażania (I i II)
		B.1.2.4. Ciprofloksacyna
		B.1.2.5. DPBS
		B.1.2.6. Trypsyna z EDTA
		B.1.2.7. GlutaMAX
		B.1.2.8. Błekit trypanu
B.2.	Rutync	we czynności w hodowli komórek
	B.2.1.	Rozmrażanie
	B.2.2.	Przesiewanie (pasażowanie)
	B.2.3.	Zamrażanie
	B.2.4.	Hodowla na płytkach

Część I Wstęp

Ciągły postęp w dziedzinie medycyny zwiększa średnią długość życia i znacząco poprawia jego komfort. Coraz większa część organów i narządów lub ich fragmentów może być z powodzeniem zastąpiona ich sztucznymi odpowiednikami. W tym celu konieczna jest ścisła integracja wprowadzonych obcych elementów z istniejącymi strukturami biologicznymi. Biomateriały, jako klasa materiałów dobrze współpracujących z żywymi tkankami, stanowią substrat do produkcji złożonych układów zastępujących ich naturalne odpowiedniki. Staw jest przykładem złożonego połączenia zdolnego wydajnie pracować pod relatywnie dużymi cyklicznymi obciążeniami przez długi okres czasu. Zaprojektowanie sztucznego odpowiednika stawia konstruktorom duże wyzwania zarówno pod względem konstrukcyjnym, jak i doboru biomateriału, który spełniać musi szereg rygorystycznych kryteriów mechanicznych. Duży postęp w tym względzie przyniosła wciąż bardzo obiecująca klasa materiałów reprezentowana przez stopy tytanu.

Celem pracy jest zbadanie biokompatybilności stopów tytanu Ti-6Al-4V, Ti-6Al-7Nb oraz Ti-6Al-7Nb z powłoką nc-TiC/a-C pod kątem wykorzystania tych materiałów do konstrukcji implantów stawowych w organiźmie ludzkim na podstawie obserwacji liczebności komórek fibroblastów ludzkich wzrastających na badanych powierzchniach.

W pierwszej części pracy zarysowujemy dotychczasowy rozwój w dziedzinie materiałów stosowanych w implantach stawowych, przybliżymy wymagania i czynności konieczne do prowadzenia hodowli komórkowej in vitro, a także opiszemy ogromny postęp jaki dokonał się w dostępnych dla badacza technikach obserwacji. W kolejnej części, wprowadzimy podstawowe informacje o próbkach wykorzystanych do badań, zarysujemy metody wykorzystane do pomiaru parametrów charakteryzujących powierzchnię, a także przedstawimy wyniki wykonanych badań. Ostatnia część badawcza poświęcona jest opisowi badań zachowania komórek wzrastających na charakteryzowanych powierzchniach za pomocą mikroskopii optycznej, Mikroskopii Sił Atomowych oraz hemocytometrycznego badania liczebności. Uzyskane wyniki podsumujemy w części ostatniej. Część II

Wprowadzenie

1. Biomateriały

1.1. Ogólna charakterystyka

Biomateriałami nazywamy syntetyczne materiały (lub ich kombinacje z materiałami naturalnymi) zastępujące część organizmu lub funkcjonujące w bliskim kontakcie z żywymi tkankami[1]. Z samej definicji wynika ich szerokie zastosowanie, stąd trudno wprowadzić jednoznaczną ich klasyfikację. Uwzględniając rodzaj i czas kontaktu biomateriału z organizmem, biomateriały podzielić możemy na zewnętrzne i wewnętrzne. W obrębie każdej z tych kategorii wyróżniamy krótkotrwały i długotrwały kontakt z organizmem.

1.2. Implanty biostatyczne i biomechaniczne

Dużym zainteresowaniem cieszą się implanty wewnętrzne mające długotrwały kontakt z organizmem. Do tej klasy należą implanty zastępujące fragmenty kości, a także TJR (ang. Total Joint Replacement) – implanty całkowicie zastępujące wybrany staw ludzki. Ostatnie stanowią szczególne wyzwanie dla bioinżynierii z uwagi na konieczność współpracy zarówno z ludzkimi tkankami (integracji z kośćmi), jak i wydajna mechaniczna prace stawu. Stad materiał taki musi spełniać szereg kryteriów: być wysoce biokompatybilny, wykazywać dużą odporność na degradację (korozję) w żywym organiźmie, wytrzymałość i odporność zmęczeniowa wystarczająca do zapewnienia wieloletniej pracy stawu pod obciążeniem, niski moduł Younga (porównywalny z wartością modułu Younga kości) w celu równomiernego przenoszenia obciążeń. Standardowe materiały wykorzystywane w roli implantów ortopedycznych, takie jak stal nierdzewna, stopy kobaltu i platyny, nie sprawdziły się w konstrukcji wydajnych TJR. Kandydatem na materiały spełniające te rygorystyczne wymogi był stop używany dotychczas w aeronautyce: Ti-6Al-4V ELI. W latach 90' odkryto Ti-6Al-7Nb [2] i Ti-5Al-2.5Fe [3], dwa stopy o właściwościach podobnych do Ti64, lecz nie zawierających potencjalnie toksycznego wanadu, uwalnianego w procesach korozji stopu [4]. Prowadzi się również badania nad stopami tytanu drugiej generacji, angażującymi molibden, cyrkon, tal, selen i pallad.

1.3. Badanie biozgodności materiału

Biozgodność jest czynnikiem warunkującym przydatność danego materiału do implantów. Zgodnie z ogólną definicją przyjętą przez European Society for Biomaterials, materiał uważa się za biokompatybilny, gdy pełni w organiźmie przewidzianą dla niego funkcję, nie wywołując niepożądanych reakcji ze strony organizmu nosiciela. Z uwagi na złożoność procesów przebiegających we wnętrzu żywego organizmu, badanie biokompatybilności jest procesem niezwykle złożonym. W pierwszej kolejności należy wziać pod uwage *cytotoksyczność* – zgodność z tkankami, z którymi materiał będzie się kontaktował bezpośrednio in vivo. Stosując linie komórek wchodzacych w skład interesujących tkanek możliwe jest pozaustrojowe zbadanie in vitro biozgodności materiału ze względu na wzrost i przeżywalność komórek. Kolejnym etapem są przedkliniczne układowe badania in vitro – symulacja fragmentu żywego organizmu zawierająca różne typy komórek zorganizowane w tkanki. Odzwierciedla to możliwość wzajemnego oddziaływania na siebie biomateriału i różnych typów komórek. Pozytywne przejście poprzednich etapów otwiera drogę do badań zachowania materiału w żywym organiźmie zwierzęcym i w końcu, jako ostatni etap, przejście do badań klinicznych na organiźmie ludzkim.

1.3.1. Dobór komórek do badań pozaustrojowych

Badanie biokompatybilności wymaga oceny zjawisk zachodzacych w wyniku wzajemnego oddziaływania biomateriału i żywych komórek. Stąd badanie jedynie wielkości charakteryzujących właściwości fizyczne i chemiczne próbki okazuje się niewystarczające. Konieczna jest względnie wierna symulacja oddziaływań zachodzacych pomiędzy komórką a powierzchnią materiału, co umożliwiają między innymi badania in vitro. Wykorzystuje się tam komórki najliczniej reprezentujące tkankę obecną w miejscu docelowego umieszczenia implantu. Zatem dla tkanki kostnej będą to osteoblasty i osteoklasty, dla tkanki łącznej – fibroblasty, a także komórki morfologiczne krwi. Komórki do badań pochodzą zwykle z banków linii komórkowych. Dystrybuowane komórki są przebadane pod względem czystości i braku skażenia obcymi wirusami, bakteriami czy grzybami. Niesie to jednak ze soba pewne ograniczenia związane z osobniczym zróżnicowaniem komórek. Obecnie podejmuje się pomyślne próby izolowania komórek do badań bezpośrednio od dawcy [1]. Technika ta jest jednak niezwykle trudna z uwagi na łatwość kontaminacji komórkami innego typu, co utrudnia zarówno samą hodowlę jak i obiektywną ocenę biozgodności materiału. Daży się więc do opracowania metod pozwalających na wyizolowanie czystych frakcji komórek pobranych od dawcy np. podczas biopsji śródoperacyjnej.

Wielopłaszczyznowe badania biozgodności, uwzględniające szeroką gamę parametrów (np. przeżywalność, tempo wzrostu, adhezja) wymagają niezmienności fenotypu linii podczas kolejnych pasaży. Tylko wówczas zapewniona jest możliwie najwyższa powtarzalność i porównywalność uzyskanych wyników. Nie zawsze jednak spełnienie tego warunku jest możliwe. Najlepszym możliwym rozwiązaniem pozostaje wtedy dopilnowanie, by na konkretnym etapie badania, komórki pochodziły z tego samego pasażu.

2. Fibroblasty

Fibroblasty są komórkami o zwykle nieregularnym, rozgałęzionym kształcie z ulokowanym pośrodku eliptycznym jądrem mogącym zawierać więcej niż jedno jąderko. Charakteryzują się obfitym występowaniem szorstkiej siateczki śródplazmatycznej i silnie rozwiniętym aparatem Golgiego. Pod błoną zawierają dobrze rozbudowany system filamentów aktynowych umożliwiający aktywny ruch komórki poprzez kroczenie. Są szczególnie aktywne w rozwijających się tkankach. Przy małym zagęszczeniu, adherując do stosunkowo dużej powierzchni, komórki te rozrastają się w gwieździste kształty utworzone przez wypustki cytoplazmy; nie posiadają one błony podstawnej. Przy zwiększonym zagęszczeniu, lokalnie formują się one w klastry zawierające równolegle ustawione komórki. W przeciwieństwie jednak do innych typów komórek (np. tkanki nabłonkowej), nie formują one monowarstw. W przypadku braku aktywności otaczających tkanek, fibroblasty przechodzą w stan spoczynkowy. Komórki są wówczas mniejsze i wrzecionowate, stąd określamy je odrębną nazwą – *fibrocyty*.

2.1. Rola i funkcje w organiźmie

Fibroblasty są komórkami najliczniej reprezentującymi tkankę łączną w organiźmie zwierzęcym (zaliczane są one do tkanki łącznej zbitej). Podstawowym zadaniem tych komórek jest produkcja kolagenu i sprężystych włókien istoty międzykomórkowej (*ECM* – extracellular matrix):

- Kolagen jest najpowszechniej u ssaków występującym białkiem. Organizuje się w fibryle tworzące długie włókna. Włókna te charakteryzują się dużą elastycznością (moduł Younga 3, 2 – 4 GPa) i giętkością przy równoczesnej wytrzymałości na rozciąganie [5].
- Włókna sprężyste zbudowane są z tworzącej rozgałęzione sieci elastyny bardzo elastycznego białka mogącego do 60% sprężyście zmieniać swoje liniowe wymiary, jego moduł Younga wynosi ok. 1 MPa [6]. Dzięki tym właściwościom, po ustąpieniu działania siły, tkanki powracają do pierwotnych rozmiarów i kształtów. Dodatkowo sieć sprężystych włókien wykorzystywana jest do krótkotrwałego magazynowania energii mechanicznej (np. w aorcie).



Rys. 2.1. Przekrój histologiczny psiego mięśnia poprzecznie prążkowanego. Strzałkami zaznaczono wybarwione komórki fibroblastów wbudowane w tkankę. [7]

Zgodnie z ogólną charakterystyką tkanki łącznej, w znacznie rozproszonej, bezpostaciowej i włóknistej substancji międzykomórkowej zawieszona jest stosunkowo niewielka liczba fibroblastów. Sieć ta stanowi strukturalną podporę dla komórek budujących wszystkie tkanki organizmu zwierzęcego. Przykładem mogą być tutaj fibroblasty wbudowane w strukturę mięśnia (por. rys. 2.1), które produkując wymienione składniki nadają mu wytrzymałość i elastyczność. Fibroblasty posiadają ponadto zdolność kroczenia dzięki rozbudowanemu systemowi filamentów aktynowych. Zjawisko to obserwowane jest w procesie gojenia się rany, w którym komórki te biorą aktywny udział. Ich rola nie ogranicza się jedynie do funkcji strukturalnych – inicjują one między innymi stan zapalny wydzielając chemokiny i cytokiny pobudzające komórki układu odpornościowego [8].

2.2. Hodowla in vitro

W związku z funkcjami pełnionymi przez fibroblasty w żywym organiźmie, metodyka ich hodowli została stosunkowo dobrze poznana. Na rynku dostępnych jest wiele linii komórkowych wyprowadzanych zarówno od zwierząt (np. linia embrionalnych fibroblastów mysich 3T3 – rys. 2.2) jak i ludzi (np. HS5, HDF, HLF). Komórki te dystrybuowane są w stanie zamrożonym. Hodowle prowadzi się w sposób charakterystyczny dla linii adherentnych, inkubując w leżących poziomo naczyniach hodowlanych zapewniających wymianę gazową z otoczeniem.



Rys. 2.2. Komórki linii komórkowej embrionalnych mysich fibroblastów 3T3 [9]

2.2.1. Krzywa wzrostu komórek w hodowli

Liczebność komórek w hodowli zmienia się nieliniowo wraz z czasem. Zależność tą nazywa się *krzywą wzrostu*. Jest ona charakterystyczna dla danego układu typ komórki-podłoże-środowisko, jednakże ogólne zachowanie jest wspólne dla wszyst-kich tego typu krzywych. Na rysunku 2.3 przedstawiona jest zależność liczebności populacji komórek wzrastających na podłożu tytanu technicznego i polistyrenu od czasu inkubacji. Zauważmy, że po początkowym powolnym wzroście liczebności w pierwszych 3 dniach hodowli, liczba komórek gwałtownie zwiększa się między 3 a 9 dobą inkubacji. Obszar ten nazywa się *fazą logarytmicznego wzrostu* hodowli.



Rys. 2.3. Krzywa wzrostu komórek fibroblastów na tytanie technicznym (cpTi – \Box) oraz polistyrenie (TPS – \triangle) [10, p. 318]

3. Laboratorium hodowli komórkowych

Prowadzenie hodowli komórkowej wymaga wyposażenia pracowni w specjalistyczny sprzęt oraz stosowne odczynniki. Z uwagi na fakt, że podczas realizacji tej pracy pełna hodowla komórkowa w wykorzystywanym laboratorium prowadzona była po raz pierwszy, w załączniku B (strona 76) zamieszczamy dokładny opis wyposażenia oraz niezbędnych do opanowania procesów.

4. Techniki pomiarowe

4.1. Mikroskopia optyczna

Od czasu wynalezienia mikroskopu optycznego przez duńską rodzinę optyków Janssenów pod koniec XVI wieku i wprowadzenia go do biologii kilka dekad później przez Antona van Leeuwenhoeka, w dziedzinie tej dokonał się ogromny postęp. Rozbudowa konwencjonalnego mikroskopu doprowadziła do powstania mikroskopów polaryzacyjnych i kontrastu fazowego, pozwalających zarejestrować niesione przez światło informacje nierozróżnialne dla ludzkiego oka. Mikroskopia fluorescencyjna pozwoliła na selektywną obserwację struktur wewnątrz złożonych obiektów biologicznych. Dalszy jej rozwój i upowszechnienie laserów zaowocowało powstaniem mikroskopu dwufotonowego. Z kolei mikroskopia konfokalna otworzyła drogę do skaningowej mikroskopii optycznej w trzech wymiarach. W końcu, zdolność detekcji informacji pola bliskiego umożliwiła obserwację struktur ze zdolnością rozdzielczą poniżej limitu dyfrakcyjnego. Poniżej opisane zostaną krótko wybrane typy mikroskopów optycznych wykorzystywane w badaniach biologicznych.

4.1.1. Mikroskop optyczny

Konwencjonalny mikroskop optyczny wykorzystuje światło widzialne i dzięki zastosowaniu układu optycznego pozwala na uzyskanie powiększeń do 1500x. W konfiguracji odbiciowej, zarówno obserwacja jak i podświetlanie odbywa się od góry. W trybie transmisyjnym, obiekt wciąż obserwowany jest od góry, jednakże światło pada na badany obiekt od dołu. Wymaga to jednak, by badany obiekt był półprzeźroczysty. W przypadku molekuł adherujących do podłoża, bardzo pomocy okazuje się mikroskop optyczny o geometrii odwróconej, w którym obserwacja może być prowadzona od dołu.

4.1.2. Mikroskop fluorescencyjny

Duża część próbek organicznych i nieorganicznych nie wykazuje w konwencjonalnym mikroskopie świetlnym kontrastu wystarczającego do rozróżnienia struktur składowych. Często w takich przypadkach pomocne okazuje się wykorzystanie zjawiska fluorescencji. Wówczas oświetlanie próbki zewnętrznym źródłem światła o określonej długości (długościach), powoduje reemisję światła o większej długości fali. Dla próbek, które nie wykazują naturalnej fluorescencji (np. chlorofil), do badanych molekuł dołącza się markery – *fluorofory*, fluoryzujące pod wpływem światła o znanej długości fali. Występują w postaci mikroskopów epifluorescencyjnych (konfiguracja odbiciowa) oraz transfluorescencyjnych (geometria transmisyjna).

4.1.3. Mikroskop konfokalny

Próbka oświetlana jest skupionym źródłem światła. Dzięki zastosowaniu niewielkiej apertury, jedynie światło pochodzące z obszaru ogniskowania trafia do detektora. Dzięki wyeliminowaniu sygnału tła spoza płaszczyzny ogniskowej, obrazy charakteryzują się wyższą rozdzielczością i kontrastem w porównaniu do konwencjonalnej mikroskopii fluorescencyjnej. Odcięcie promieni pozaosiowych na aperturze wiąże się jednak ze znaczącym spadkiem natężenia światła, wymagają więc one dłuższej ekspozycji. Dzięki zastosowaniu laserów i komputera, możliwe stało się rozwinięcie skaningowej laserowej mikroskopii optycznej (CLSM – ang. *Confocal Laser Scanning Microscopy*). Światło lasera skupione przez układ optyczny do obszaru zbliżonego do limitu dyfrakcyjnego skanuje próbkę punkt po punkcie w kierunkach lateralnych oraz głębokościowo. Dzięki temu możliwa jest rekonstrukcja wysokorozdzielczego trójwymiarowego obrazu badanej powierzchni.

4.1.4. Mikroskop skaningowy bliskiego pola

Zdolność rozdzielcza mikroskopów optycznych ograniczona jest przez limit dyfrakcyjny, zgodnie z kryterium Rayleigha równy w przybliżeniu połowie długości fali wykorzystywanego światła. Mikroskop skaningowy bliskiego pola (ang. *Near Field Scanning Optical Microscope* – NSOM/SNOM) pozwala zejść poniżej tego limitu dzięki detekcji fal zanikających obecnych w bliskim polu. Zdolność rozdzielcza uzyskiwanego obrazu zależy wówczas od apertury detektora, który znaleźć się musi w dużej bliskości badanej powierzchni. Uzyskiwane zdolności rozdzielcze dochodzą do 20 nm w kierunkach lateralnych i 3 nm w kierunku prostopadłym do próbki [11].

4.1.5. Spektroskopia bliskiego pola

Rozwinięciem metod mikroskopowych jest spektroskopia bliskiego pola wykorzystująca na przykład efekt Ramana nieelastycznego rozpraszania światła. Dzięki efektom wzmocnienia (SERS – Fleischmann¹ and co. (1974) [13] i TERS – Stöckle *et al.* (2000) [14]), w technikach tych kłopotliwe stosowanie nanometrowej apertury może być zastąpione ostrzami stosowanymi w mikroskopii STM i AFM. Otwiera to drogę dla metod pozwalających na równoczesną rejestrację informacji o topografii i składzie chemicznym powierzchni w nanometrowej skali.

4.2. Mikroskopia Sił Atomowych

Od roku 1985, gdy G. Binnig, C. F. Quate i Ch. Gerber z IBM Laboratory zaprezentowali pierwszy Mikroskop Sił Atomowych (AFM, ang. *Atomic Force Microscope*), technika ta stała się powszechnie wykorzystywana w większości liczących się laboratoriów naukowych. Dzięki swojej precyzji (nanometrowa rozdzielczość w 3 wymiarach), możliwości obrazowania w powietrzu, próżni i cieczy, znalazł on bardzo szerokie zastosowanie nie tylko w fizyce, ale również w chemii, biologii i medycynie, o czym świadczą tysiące publikacji powstałych w wyniku jego zastosowania. Oprócz topografii powierzchni, dzięki szerokiemu spektrum trybów pracy AFM pozwala uzyskać informacje o chropowatości, tarciu, kontraście fazowym, elastyczności, sile adhezji, właściwościach elektrycznych i magnetycznych, umożliwia również litografię.

4.2.1. Budowa

Schemat konstrukcji Mikroskopu Sił Atomowych przedstawiony jest na rysunku 4.1. Badana próbka umieszczona jest na skanerze piezoelektrycznym. Może on zmieniać względne położenie pomiędzy próbką i cantileverem w płaszczyźnie x-y równoległej do próbki, umożliwiając tym samym skanowanie jej powierzchni. Poprzez wydłużanie i kurczenie tubki piezoelektrycznej, skaner zmienia położenie w kierunku z prostopadłym do płaszczyzny x-y. Oddziaływanie ostrza z powierzchnią próbki powoduje jego wygięcie, które rejestrowane jest przez układ detekcji optycznej. Promień lasera odbijając się od powierzchni dźwigni pada na czteropozycyjną fotodiodę. Umożliwi to nie tylko detekcję ugięcia cantilevera, ale również jego lateralnych skręceń. Sygnał z fotodiody połączony jest pętlą ujemnego sprzężenia zwrotnego ze skanerem piezoelektrycznym, stabilizując żądaną wartość ugięcia cantilevera w zależności od wybranego trybu pracy.

¹M. Flieschmann oprócz odkrycia efektu wzmocnienia powierzchniowego sygnału ramanowskiego, jest również autorem zamieszania związanego z rzekomym odkryciem przez niego tzw. zimnej fuzji termojądrowej (1989) [12].



Rys. 4.1. Schemat konstrukcji Mikroskopu Sił Atomowych

4.2.2. Zasada działania

Siła występująca pomiędzy atomami ostrza a podłożem ma złożony charakter. Jest wypadkową szeregu oddziaływań, w tym chemicznych, van der Waalsa, coulombowskich oraz napięcia powierzchniowego. Potencjał Lennarda-Jonesa opisuje w sposób przybliżony zależność omawianego oddziaływania od odległości r:

$$V(r) = 4\varepsilon \left(\left(\frac{\alpha}{r}\right)^{12} - \left(\frac{\alpha}{r}\right)^6 \right), \tag{4.1}$$

gdzie ε jest czynnikiem skali, natomiast α określa położenie równowagowe pomiędzy rejonem oddziaływań przyciągających i odpychających.



Rys. 4.2. Potencjał Lennarda-Jonesa przybliżający oddziaływanie pomiędzy ostrzem i próbką. Zaznaczono strefy wykorzystywane przez podstawowe mody pracy mikroskopu.

Funkcjonowanie podstawowych trybów pracy mikroskopu omówimy analizując obszary zaznaczone na rys. 4.2 powyżej.

- **Mod kontaktowy** W tym modzie, odległość między ostrzem i próbką zmniejsza się do momentu wzajemnego kontaktu. Cantilever ugina się wówczas o xpod wpływem odpychającej siły F działającej na ostrze, rzędu nanonewtonów. Jest ona równoważona przez siłę sprężystości belki, zgodnie z prawem Hooka: F = -kx. Stała sprężystości k wykorzystywanych tutaj cantileverów waha się od 0.01 do kilku N/m. W trybie stałej siły, układ sprzężenia zwrotnego dopasowuje położenie próbki w z dążąc do zachowania stałej wartości ugięcia cantilevera. Zatem podczas skanowania, położenie skanera w kierunku prostopadłym do powierzchni odzwierciedla jej topografię. Alternatywą dla gładkich próbek jest tryb stałej wysokości, w którym skaner pozostaje nieruchomy w z a informacja o topografii uzyskiwana jest na podstawie ugięcia cantilevera.
- Mod bezkontaktowy Cantilever wprawiany jest w drgania o częstotliwości zbliżonej do rezonansu. Zbliżając się do próbki, doznaje działania przyciągającej siły (rzędu pikonewtonów), która powoduje nieznaczną zmianę częstotliwości drgań własnych, co pociąga za sobą zmianę amplitudy drgań. Zmiana amplitudy stanowi sygnał wejściowy dla pętli sprzężenia zwrotnego dostosowującej położenie skanera w z tak, by zachować stałą amplitudę drgań belki. Topografię próbki odzwierciedla, podobnie jak w przypadku modu kontaktowego stałej siły, pozycja skanera w z.
- Mod przerywanego kontaktu Podobnie jak w modzie bezkontaktowym, cantilever oscyluje z częstotliwością zbliżoną do rezonansu w pobliżu próbki, lecz na granicy pomiędzy przyciągającym a odpychającym charakterem działających sił. Oznacza to, że ostrze jest w kontakcie z próbką jedynie przez bardzo krótką część okresu drgań. Dzięki temu, odkształcenia próbki są mniejsze niż w modzie kontaktowym, co umożliwia wydajniejsze obrazowania próbek miękkich, w tym biologicznych.

4.2.3. Wykorzystanie w pomiarach biologicznych na wybranych przykładach

4.2.3.1 Obrazowanie in sitiu żywych struktur

Dzięki możliwości obrazowania struktur nieprzewodzących, AFM pozwala na badania struktur organicznych w nanoskali. Dodając do tego pracę w *komórce cieczowej* pozwalającej na zachowanie warunków fizjologicznych i pomiary w środowisku płynnym, mikroskopia ta otworzyła drogę do wydajnej i relatywnie prostej obserwacji żyjących struktur biologicznych w niespotykanej wcześniej skali. W przeciwieństwie do wykorzystywanej wcześniej w podobnych celach mikroskopii elektronowej, w przypadku AFMu preparatyka ograniczona jest do minimum. W przypadku obiektów wystarczająco silnie związanych do podłoża, wystarczy umieścić je w komórce cieczowej i rozpocząć pomiar. W przeciwnym wypadku, można zwiększyć adhezję przez naniesienie obiektów na specjale podłoże, utrwalić za pomocą środków chemicznych (takich jak aldehyd glutarowy) lub wykorzystać miejsca wiążące znajdujące się na powierzchni żywych obiektów i za pomocą cząsteczki pośredniczącej związać je nieinwazyjnie do podłoża (np. wiązanie za pomocą fibronektyny).

W przypadku badania miękkiej lub słabo związanej materii, często alternatywą dla inwazyjnego w tym przypadku modu kontaktowego jest tryb przerywanego kontaktu, zwany również modem dziobiącym. Pewną przeszkodę stanowi tutaj płynne środowisko w komórce cieczowej, które wykazuje znacząco wyższy niż w powietrzu opór i lepkość podczas ruchu oscylacyjnego belki. Na rysunkach 4.3 przedstawiamy krzywe rezonansowe wykorzystywanych belek i obrazy powierzchni stopu tytanu uzyskane dla cantileverów wykorzystywanych do badań w niniejszej pracy: Veeco MLCT oraz Veeco RTESP. Obraz charakteryzujący się największym kontrastem i ostrością uzyskano dla cantilevera RTESP. Jednakże jego znaczna twardość (ponad 20 N/m) sugeruje ograniczone zastosowanie dla próbek biologicznych. Dla pozostałych, miększych belek otrzymany obraz charakteryzuję się mniejszą ostrością, jednakże wystarcza ona do oceny większych struktur.



(b) Veeco MLCT D

Rys. 4.3. Obraz powierzchni tytanu uzyskany w tappingu w cieczy różnymi ostrzami (kontynuacja na dalszej stronie).



Rys. 4.3. Obraz powierzchni tytanu uzyskany w tappingu w cieczy różnymi ostrzami (kontynuacja na dalszej stronie).



(e) Veeco RTESP

Rys. 4.3. Obraz powierzchni stopu tytanu uzyskany w tappingu w cieczy różnymi ostrzami (kontynuacja z poprzednich stron).

4.2.3.2 Badanie elastyczności błon biologicznych

Budowa AFMu umożliwia wyznaczenie krzywej siła-odległość w ustalonym punkcie badanej powierzchni. Krzywa ta przedstawia zależność pomiędzy względnym położeniem (w kierunku pionowym z) cantilevera i próbki a odgięciem cantilevera, które może być przeliczone na siłę przy znajomości stałej sprężystości k belki. W przypadku próbek sztywnych, w wyniku sprężystego odkształcenia belki otrzymujemy liniową zależność w obszarze kontaktu ostrza z próbką opisywaną prawem Hooka. Dla próbek elastycznych, do których należą błony biologiczne, mamy do czynienia z bardziej złożonym oddziaływaniem dwóch ciał odkształcających się sprężyście. Opis takiego układu jest nietrywialny, dodatkowo utrudniony przez brak dokładnej znajomości parametrów determinujących właściwości sprężyste ostrza (kształtu, wymiarów, modułu Younga E, Kirchhoffa G oraz współczynnika Poissona ε). Powstało wiele teorii opisujących w sposób przybliżony zachowanie takiego układu, co pozwala oszacować właściwości elastyczne badanej struktury. Jednym z bardziej popularnych jest, będący rozszerzeniem teorii Hertza, model Sneddona zakładający indentację sztywnym, gładkim ostrzem rozciągłej powierzchni przy zaniedbaniu sił powierzchniowych i adhezji [15]. Zbierając krzywe siła odległość w wielu miejscach wewnatrz ustalonego na podstawie topografii obszaru, możemy dokonać mapowania elastyczności badanego obiektu.

4.2.3.3 Badanie adhezji i oddziaływań międzymolekularnych

Oddziaływania ligand-receptor, przeciwciało-antygen są podstawowymi mechanizmami przekazywania sygnału inicjującego złożone odpowiedzi układów biologicznych. Możliwe jest oszacowanie prawdopodobieństwa związania i pomiar siły jego zerwania. W tym celu ostrze pokrywa się związkiem, który może być wiązany przez molekuły znajdujące się na podłożu. Stosując (dynamiczną) spektroskopię sił, bazując na wciąż udoskonalanych modelach można wyznaczyć wspomniane wcześniej wielkości charakteryzujące wiązanie kompleksu [16].

4.2.3.4 Chemiczna analiza nanostruktur biologicznych

Niedawno podjęto próby łączenia AFMu z technikami pozwalającymi na wysokorozdzielczy pomiar optyczny (CLSM – Hansma et al. (1995) [17] oraz NSOM – Akamine et al. (1996) [18]), a także spektroskopie dalekiego i bliskiego pola (patrz część 4.1.5 na stronie 15). Relatywnie nieliczne jak do tej pory publikacje poświęconych zastosowaniom biologicznym omawianych technik przedstawiają bardzo obiecujące wyniki. Otwierają one zupełnie nowe możliwości w dziedzinie badań biologicznych. Umożliwiła badanie zewnątrzkomórkowych substancji polimerowych (EPS – ang. extracellular polymeric substances), które najprawdopodobniej odpowiedzialne są za nie do końca wyjaśnione mechanizmy komunikacji i wiazania niektórych mikroorganizmów stanowiące znaczne utrudnienie w procesie wydajnego oczyszczania wody [19, 20]. Prowadzone są intensywne prace nad sekwencjonowaniem DNA i RNA z wykorzystaniem tej techniki. Dostępne publikacje identyfikują w widmach pojedyncze zasady azotowe wchodzące w skład nukleotydów kwasów nukleinowych dając jednak przesłanki i podwaliny pod techniki umożliwiające pełne sekwencjonowanie [21]. Przedstawiono również prace stwierdzające możliwość badania dynamiki molekularnej in sitiu zachodzącej w błonach bakterii na przykładzie Staphylococcus epidermidis [22]. Prace obok przewidywań nowych odkryć dzięki połączeniu AFMu i spektroskopii ramanowskiej bliskiego pola, wymieniają liczne konieczne do przezwyciężenia problemy. Jedynie 10-20% ostrzy wykazuje wzmocnienie sygnału, a ponadto już niewielkie zabrudzenie ostrza powoduje gwałtowny jego spadek [21]. Konieczne wydaje się opracowanie teorii opisującej zależność wzmocnienia od kształtu, wymiarów i materiału pokrycia ostrza i długości wykorzystywanej fali świetlnej. Po opanowaniu produkcji ostrzy dostosowanych do warunków doświadczalnych, technika ta ma szansę stać się rutynową metodą badawczą o potężnych możliwościach.

4.3. Hemocytometria

Wraz z upowszechnianiem się hodowli komórkowych, opracowano wiele metod szacowania liczebności populacji komórek w hodowli. Tradycyjnie, zliczanie komórek wykonuje się pod mikroskopem optycznym w specjalnie przystosowanej komorze, czasami wykorzystując dodatkowo barwnik pozwalający na odróżnienie komórek żywych od martwych. Alternatywne metody wykorzystują depozycję radioizotopu jako miarę aktywności syntezy DNA, hemocytometry automatyczne i techniki enzymatyczne takie jak *MTT* (spektrofotometryczna ocena aktywności komórek wykorzystująca aktywność dehydrogenazy mitochondrialnej). W sprzedaży dostępne są elektroniczne liczniki komórek – automatyczne hemocytometry. Do szybkiego oszacowania liczby komórek wciąż jeszcze najpopularniejsze są manualne metody optyczne. W tym celu najczęściej obserwuje się wybarwione uprzednio komórki wprowadzone do hemocytometru – komory zawierającej naniesioną siatkę. Zliczając komórki występujące w poszczególnych oczkach siatki, możemy oszacować ich liczebność w pierwotnej próbce.

4.3.1. Komora Bürkera

Komora (siatka) Bürkera jest przykładem hemocytometru stworzonego na potrzeby zliczania komórek morfologicznych krwi (leukocytów i erytrocytów). Stanowi ją komora o głębokości 0.1 mm zawierająca siatkę składającą się z 9 dużych kwadratów o powierzchni 1 mm^2 , które z kolei dzielą się na 16 kwadratów grupowych o powierzchni 0,04 mm^2 . Kwadraty grupowe rozdziela przerwa o szerokości 0,05 mm.

4.3.1.1 Przygotowanie roztworu

W celu zliczenia komórek w hodowli, peletkę powstałą po odwirowaniu zawieszamy w 3 cm^3 DMEM. W zależności od przewidywanego rzędu stężenia komórek, wybieramy z poniższej tabelki odpowiednie stężenie czynnika barwiącego:

Objętość zawiesiny z komórkami	Objętość błękitu trypanu	Liczba komórek/ml
$10 \ \mu l$	1 ml	n-zliczeń $\cdot 10^6$
$10 \ \mu l$	$100 \ \mu l$	n-zliczeń $\cdot \; 10^5$

Stężenie barwnika powinno być tak dobrane, by wewnątrz kwadratu grupowego znajdowało się kilkadziesiąt komórek. Zarówno zbyt mała jak i zbyt duża liczba komórek w komorze znacząco zmniejsza dokładność metody. Błękit trypanu powoduje szybkie obumieranie komórek, stąd zmieszania z barwnikiem należy dokonać tuż przez zliczaniem.

4.3.1.2 Przygotowanie komory

Na umytej uprzednio komorze umieszczamy szkiełko nakrywkowe (rys. 4.5). Następnie za pomocą pipety wprowadzamy ok. 20 μl roztworu zawierającego rozcieńczone wcześniej barwnikiem komórki. W wyniku efektu kapilarnego, wprowadzany roztwór zostanie wciągnięty do wnętrza komory. Należy zadbać o to, by ciecz wewnątrz niej rozlała się równomiernie. Tak przygotowaną komorę umieszczamy pod mikroskopem odwróconym tak, by widoczna była siatka.

4.3.1.3 Zliczanie komórek

Na mikroskopie wybieramy powiększenie 10x. Ustawiamy siatkę tak, by widoczny był duży kwadrat grupowy o polu 1 mm^2 , taki jak przedstawiony na rysunku 4.4. W celu ułatwienia procesu zliczania i ograniczenia błędów związanych z wielokrotnym zliczeniem tej samej komórki, sugerujemy wprowadzenie następujących konwencji:

- zliczamy komórki od lewej do prawej na zmianę szerszy wiersz małych kwadratów o boku 0,2 mm i wiersz węższy ograniczony od góry i dołu kwadratami,
- podczas zliczania komórek w bieżącym wydzielonym myślowo obszarze zliczamy jedynie komórki znajdujące się wewnątrz oraz na górnej i lewej krawędzi. Nie zliczamy komórek znajdujących się na dolnej i prawej krawędzi obszaru (por. rys. 4.4).

Notujemy liczbę komórek żywych i w razie konieczności również martwych (błękit trypanu intensywniej wnika przez pęknięte błony martwych komórek i nie jest z nich wydalany). Następnie zliczanie ponawiamy dla kolejnego kwadratu grupowego. Korzystnie jest uzyskać statystykę z przynajmniej 5 różnych kwadratów. Liczebność komórek jest równa średniej ze zliczonych wartości.

4.3.1.4 Oszacowanie liczby komórek

Dla ustalenia uwagi załóżmy, że zliczyliśmy n komórek wewnątrz kwadratu grupowego. Na początek obliczmy jego objętość. Miał on głębokość 0, 1 mm i bok 1 mm, stąd:

$$V_{\Box} = 0, 1 \cdot 1 \cdot 1 = 0, 1 \ mm^3$$

W tej objętości znajdowało się n komórek, stąd otrzymujemy stężenie:

$$c_{\Box} = n \cdot 10^1 \text{ komórek}/mm^3 = \mathbf{n} \cdot \mathbf{10^4} \text{ komórek}/\mathbf{ml}$$

Zwróćmy uwagę, że otrzymana wartość c_{\Box} jest stężeniem komórek w rozcieńczonym barwnikiem roztworze. W celu uzyskania stężenie komórek w roztworze wyjściowym, otrzymaną wartość należy pomnożyć przez krotność rozcieńczenia barwnikiem.



Rys. 4.4. W komorze Bürkera pod mikroskopem widoczna jest kwadratowa siatka złożona z 9 dużych kwadratów o powierzchni 1 mm^2 , które z kolei dzielą się na 16 kwadratów grupowych o powierzchni 0,04 m^2 .



Rys. 4.5. Komora Bürkera składa się z płytki z wydrążoną komorą o głębokości 0,1mm z naniesionymi dwoma siatkami.

Część III

Charakterystyka badanych powierzchni

1. Pochodzenie i ogólna charakterystyka próbek

Próbki materiałów do zbadania biokompatybilności zostały dostarczone przez doktora Tomasza Moskalewicza z Pracowni Mikroskopii Elektronowej i Badan Fizycznych Wydziału Inżynierii Metali i Informatyki Przemysłowej Akademii Górniczo-Hutniczej w Krakowie. Otrzymaliśmy siedem próbek stopów² tytanu w kształcie wycinka koła o powierzchni nie przekraczającej 1 cm^2 :

- 1. 2 próbki (polerowana i szlifowana papierem o gradacji 1200) jednorodnego stopu Ti-6Al-7Nb (Ti67),
- 2. 2 próbki (polerowana i szlifowana papierem o gradacji 1200) jednorodnego stopu Ti-6Al-4V (Ti64),
- 3. 3 próbki stopu Ti-6Al-7Nb-O₂ z 290 nm powłoką nc-TiC/a-C (2-5 nm nano-krystaliczny TiC w osnowie amorficznego węgla).

Próbki opisane w punkcie 2. zawierają toksyczny dla organizmów żywych wanad [4], stąd przypuszcza się, że może wykazywać mniejszą biokompatybilność w stosunku do stopu zawierającego niob (Ti67).

1.1. Próbka platyny

Dla porównania cytotoksyczności stopów tytanu z biomateriałem powszechnie już wykorzystywanym, zdecydowaliśmy się do badanych próbek dodać krążek platyny. Otrzymaliśmy go poprzez wyciśnięcie w przygotowanej wcześniej formie pręcika platynowego na prasie mechanicznej. Powierzchnia otrzymanej próbki była polerowana pastą diamentową *Mager DC-116* o średnicy ziarna 1 μm , a następnie *Mager DC-106* o średnicy ziarna 0.25 μm . Zdjęcia poniżej (rys. 1.1 prezentują zmianę topografii próbki wraz z polerowaniem. Ostateczną powierzchnię, uzyskaną po polerowaniu pastą o najmniejszej gradacji, zamieszczamy na rysunku A.12 w Załączniku A na stronie 75.

²Liczba przy symbolu atomu w stopie oznacza jego masową zawartość procentową (wt%).



Rys. 1.1. Topografia próbki platyny uzyskana przy pomocy Mikroskopu Sił Atomowych w modzie kontaktowym.

2. Właściwości fizyczne stopów tytanu

Stopy tytanu są klasą materiałów charakteryzującą się relatywnie dużą wytrzymałością na rozciąganie, niską wagą i wyjątkową odpornością na korozję. Tak jak opisywaliśmy w części 1.2 (str. 8), właściwości fizyczne tych stopów bardzo dobrze wpasowują się w wymagania stawiane materiałom na implanty stawowe.

Wprowadzenie tytanu technicznego (tytan bez domieszek, cpTi) do zastosowań biomedycznych było przełomem niwelującym wady dominującej w tej dziedzinie stali nierdzewnej, takie jak korozja (i związane z nią inicjowanie stanów zapalnych przez uwalnianie jonów z powierzchni metalu) i wysoki moduł Younga. Wieloletnie obserwacje pokazały, że ograniczone przenoszenie obciążeń i naprężeń pomiędzy implantem a kościa prowadzi do procesów jej resorpcji, a co za tym idzie, zmniejszenia jej wytrzymałości [23]. Jest to naturalny proces, poddawanie kości systematycznemu, zwiększonemu obciążeniu i działaniu sił skręcających pobudza ją i powoduje jej wzmocnienie i rozrost. Odwrotna sytuacja natomiast, długotrwałe zmniejszenie napreżeń i działających momentów prowadzi do zredukowania masy kości, jej grubości i zmniejszenia wytrzymałości. Opisany proces, zwany w literaturze biomedycznej ekranowaniem napreżeń, silnie zależy od elastyczności współpracujących materiałów – w tym przypadku kości i stopu. W tabeli 2.1 zebrano informacje o właściwościach mechanicznych wybranych substancji. Zauważmy, że moduł Younga tytanu i jego stopów jest bliższy elastyczności kości i o połowę mniejszy od modułu Younga stali nierdzewnej. Stopy tytanu drugiej generacji, takie jak Ti-35Nb-5Ta-7Zr (TNZT) odzwierciedlaja dażenie do minimalizacji efektu ekranowania napreżeń przy zachowaniu pozostałych pożądanych dla materiałów na implanty właściwości.

Tab. 2.1. Właściwości mechaniczne wybranych materiałów wykorzystywanych w implantach ortopedycznych (E – moduł Younga, R_{sp} – granica sprężystości, R_m – wytrzymałość na rozciąganie) [23].

Oznaczenie materiału	Mikrostruktura	E [GPa]	$R_{sp}~[MPa]$	$R_m [\mathrm{MPa}]$
kość	kompozyt hydroksy-	10-40		150-400
	apatytu i kolagenu			
stal nierdzewna 316L	$\{austenit\}$	200	170 - 750	465-950
cpTi	$\{\alpha\}$	105	692	785
Ti-6Al-4V	$\{lpha/eta\}$	110	850-900	960-970
Ti-6Al-7Nb	$\{lpha/eta\}$	105	921	1024
Ti-35Nb-5Ta-7Zr (TNZT)	{metastabilna β }	55	530	590

3. Wielkości opisujące chropowatość powierzchni

Chropowatość jest miarą odchylenia rzeczywistej powierzchni od gładkiej płaszczyzny. Powierzchnie o dużej chropowatości nazywamy szorstkimi, natomiast o małej – gładkimi. Parametry opisujące chropowatość są kluczowe przy ocenie oddziaływania powierzchni ze środowiskiem, zarówno podczas badań trybologicznych, wydajności mechanicznej jak i biozgodności [24]. W celu oceny chropowatości, konieczne jest uzyskanie informacji o topografii powierzchni w mikroskali. Dla ustalenia uwagi, potraktujmy wynik badania jako regularną siatkę o rozmiarach $a \times b$, a więc składającą się z $n = a \cdot b$ punktów. Niech y_i oznacza wysokość zmierzoną w punkcie *i*. Wówczas chropowatość powierzchni opisać możemy następującymi parametrami:

 $\mathbf{R}_{\mathbf{a}}$ (Roughness Average)

$$R_a = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^{n} |y_i| \tag{3.1}$$

Jest to średnia arytmetyczna modułów wysokości.

 $\mathbf{R}_{\mathbf{q}}$ (Root Mean Square)

$$R_q = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^{n} y_i^2}$$
(3.2)

Parametr ten jest wyrażony przez średnią kwadratową wysokości.

 $\mathbf{R_{sk}}$ (Skośność)

$$R_{sk} = \sqrt{\frac{1}{nR_q^3} \sum_{i=1}^n y_i^3}$$
(3.3)

Skośność jest miarą asymetrii rozkładu wysokości. Dla rozkładów o lewostronnej asymetrii przyjmuje wartości ujemne, dla prawostronnych dodatnie, natomiast dla rozkładów symetrycznych jest równy zero.

 $\mathbf{R}_{\mathbf{ku}}$ (Kurtoza)

$$R_{ku} = \sqrt{\frac{1}{nR_q^4} \sum_{i=1}^n y_i^4}$$
(3.4)

Kurtoza określa spłaszczenie rozkładu wysokości. Dla rozkładu normalnego wynosi 3. Jeśli rozkład wysokości jest bardziej skoncentrowany, kurtoza jest większa od tej wartości, w przeciwnym wypadku jest mniejsza od 3.

Powyższe parametry zostały wybrane jako optymalne do opisu chropowatości pod kątem biokompatybilności [10, 24, 25].

4. Przygotowanie próbek

Oczyszczenie i przygotowanie próbek do badań jest czynnością warunkującą poprawność i powtarzalność uzyskiwanych wyników pomiarowych. Próbki dostarczone do badań pochodziły z fragmentów wykorzystywanych wcześniej do badań wytrzymałościowych (takich jak pomiary twardości, wytrzymałości na ścieranie). Niestety w związku z powyższym, otrzymaliśmy próbki niewielkich rozmiarów charakteryzujące się sporym zabrudzeniem. Początkowo wykorzystaliśmy metodę polegającą na oczyszczeniu próbki wacikiem i przelewaniu jej etanolem oraz wodą destylowaną naprzemiennie z bocznym osuszaniem strumieniem sprężonego azotu. Jednakże w wyniku takiego procesu nie udało się usunąć wszystkich zanieczyszczeń. W konsekwencji do oczyszczenia zdecydowaliśmy się wykorzystać myjkę ultradźwiękową. Poniżej prezentujemy metodę czyszczenia wg. *protokołu Brånemark* [26] próbek przeznaczonych do badań wykorzystujących hodowle komórkowe. Procedura składa się z kilku etapów:

- 1. czyszczenie w myjce ultradźwiękowej w butanolu przez 10 min,
- 2. dwukrotne przepłukiwanie 99% etanolem,
- 3. czyszczenie w myjce ultradźwiękowej w 99% etanolu przez 10 min,
- 4. dwukrotne przepłukanie wodą destylowaną,
- 5. czyszczenie w myjce ultradźwiękowej w wodzie destylowaniej przez 10 min w sterylnym szklanym naczyniu
- 6. sterylizacja pod lampą UV w komorze laminarnej przez 1h.

Wszystkie powyższe czynności powinne być przeprowadzone w dygestorium, a próbki przenoszone autoklawowanymi pęsetami.

5. Jakościowa ocena pod mikroskopem optycznym

W pierwszej kolejności powierzchnia została oceniona pod mikroskopem optycznym. Pozwoliło to na ocenę jej czystości oraz jednorodności struktury w obrębie pojedynczej próbki.



Rys. 5.1. Mikroskop NTEGRA SPECTRA [27]

5.1. Wykorzystane przyrządy

W pierwszej części badania wykorzystaliśmy mikroskop optyczny będący częścią zestawu NTEGRA Spectra (rys. 5.1). Dysponował on obiektywami o powiększeniu $10 \times i 100 \times sprzężonymi z matrycą CCD o rozdzielczości 768 \times 576 px^2$.



Rys. 5.2. Mikroskop Park XE-120 [28]

W drugiej części posłużyliśmy się mikroskopem optycznym wbudowanym w system *Park XE-120* (rys. 5.2). Wykorzystuje on kamerę CCD *Marlin F-080C* o rozdzielczości 1032 × 778 px^2 zamocowaną nad obiektywem o 10 krotnym powiększeniu. Widziany obszar wynosi 480 × 360 μm^2 . Obraz został dodatkowo wyskalowany przy pomocy komory Bürkera, dla której wymiary siatki znane są z dokładnością mikrometryczną.

5.2. Analiza uzyskanych obrazów

Rysunki 5.3-5.5 przedstawiają zdjęcia powierzchni, wyczyszczonych uprzednio zgodnie z procedurą opisaną w 4. Analizując obrazy możemy zauważyć, że mikrostruktura powierzchni polerowanych i szlifowanych jest podobna, niezależna od stopu. Po całościowych oględzinach stwierdzamy, że wcześniejsze zabrudzenia zostały usunięte, procedura czyszczenia próbek jest skuteczna. Na wszystkich powierzchniach widoczne również były poprzeczne bruzdy, występujące nieregularnie w różnych częściach próbek. Prawdopodobnie są to ślady procesów technologicznych, którym poddane były próbki podczas wcześniejszych badań, przed ich przekazaniem do badań biokompatybilności. Na powierzchniach szlifowanych widoczny jest układ podłużnych, równoległych bruzd będących wynikiem chropowacenia papierem ściernym o gradacji 1200. Próbka nc-TiC/n-C charakteryzowała się dużą niejednorodnością. Zaobserwowaliśmy obszary znacząco różniące się faktura powierzchni, co zilustrowane zostało na rysunku 5.5. Przypuszczamy, że zostało to spowodowane mechanicznym uszkodzeniem próbki podczas wcześniejszych badań (ocena twardości, odporności na ścieranie itp.). Utrudnia to badanie zależności wzrostu komórek od chropowatości dla tej powierzchni.

6. Kąt zwilżania

6.1. Podstawy fizyczne

Zwilżanie jest procesem zachodzącym przy kontakcie z ciałem stałym fazy ciekłej i gazowej. Po ustaleniu się równowagi, granica faz ciecz-gaz ustala się pod kątem θ do poziomu (por. rys. 6.1).



Rys. 5.3. Zestawienie obrazów dla Ti64 przy pomocy mikroskopu optycznego NTGRA



Rys. 5.4. Zestawienie obrazów dla Ti67 przy pomocy mikroskopu optycznego NTGRA



Rys. 5.5. Zestawienie obrazów dla badanych próbek przy pomocy mikroskopu optycznego systemu Park.



Rys. 6.1. Ilustracja zjawiska zwilżania na przykładzie kropli cieczy na płaskiej powierzchni.

W stanie równowagi termodynamicznej, napięcia powierzchniowe γ na granicach faz ciecz-gaz (LG), ciecz-ciało stałe (SL) i gaz-ciało stałe (SG) równoważą się:

$$0 = \gamma_{SG} - \gamma_{SL} - \gamma_{LG} \cos \theta. \tag{6.1}$$

Powyższe równanie (zwane równaniem Younga), determinuje wartość kąta zwilżania:

$$\theta = \arccos \frac{\gamma_{SG} - \gamma_{SL}}{\gamma_{LG}}.$$
(6.2)

Kąt zwilżania jest miarą hydrofobowości powierzchni. W przypadku powierzchni silnie hydrofilowych, kąt zwilżania będzie zbliżał się do 0 – ciecz będzie rozlewała się równomiernie po powierzchni. Dla hydrofobowych substancji, oddziaływania cieczciało stałe są słabsze, stąd kąt zwilżania rośnie. Za umowną granicę hydrofobowości przyjmuje się kąt 90°.

6.2. Metoda pomiaru



Rys. 6.2. Goniometr *Ramé-Hart Model 200* wraz z wykonanym podczas pomiarów zdjęciem kropli wody na powierzchni Ti64.

Do pomiaru kąta zwilżania wykorzystaliśmy goniometr *Ramé-Hart Model 200*. Kąt mierzyliśmy metodą statyczną wykorzystując ultraczystą wodę oraz DPBS. Woda stanowi standardową referencję, natomiast druga z wykorzystanych substancji jest buforem fizjologicznym zapewniającym optymalne dla żywych komórek warunki środowiskowe. Wszystkie próbki zostały wcześniej oczyszczone zgodnie z opisem w części 4. W modzie statycznym, kroplę o ustalonej objętości umieszczamy na badanej powierzchni za pomocą precyzyjnej strzykawki. Następnie ustawiając ustaloną kroplę w centrum pola widzenia, wykonujemy zdjęcie kamerą CCD będącą częścią goniometru. Dla każdej powierzchni wykonaliśmy 6 powtórzeń. Otrzymane fotografie zostały poddane obróbce w programie *SPIP*, którego również użyto do ustalenia wartości kątów zwilżania.

6.3. Wyniki

Pomiary przeprowadziliśmy dla 8 powierzchni: badanych próbek tytanu, a także szkła oraz polistyrenu (będącego materiałem, z którego wykonane są naczynia do prowadzenia hodowli komórkowych). Wyniki wraz z niepewnościami zebrano na wy-kresie przedstawionym na rysunku 6.3.



Rys. 6.3. Zestawienie wyników pomiarów kąta zwilżania badanych powierzchni dla dwóch cieczy odniesienia (ultraczystej wody i bufora fizjologicznego DPBS).

Zauważmy, że wszystkie badane powierzchnie wykazują właściwości hydrofilowe. Nie obserwujemy zmiany kąta zwilżania dla powierzchni tego samego typu różniących się jedynie chropowatością. Obserwujemy mniejsze kąty zwilżania dla DPBSu
niż dla wody. Wnioskujemy stąd, że oddziaływanie DPBSu z powierzchnią jest silniejsze niż oddziaływanie wody. Największą różnicę (ok. 16°) obserwujemy dla Ti64. Stwierdzamy, że kąty zwilżania wszystkich powierzchni stopów tytanu oraz platyny leżą w podobnym zakresie. Szkło wykazuje właściwości silnie hydrofilowe w przeciwieństwie do polistyrenu, dla którego zmierzony kąt zwilżania przekraczał 80°.

7. Badanie topografii przy użyciu AFM

7.1. Metoda pomiarowa

Estymując rozmiary nierówności powierzchni i średni rozmiar komórek fibroblastów (~10 μ m), zdecydowaliśmy się na wykonanie skanów o polu 50 × 50 μ m². W drugiej części eksperymentu, pomiary powtórzyliśmy dla fragmentów powierzchni o polu 5 × 5 μ m². Próbki były badane na mikroskopie *DI Veeco Multimode* w modzie kontaktowym. Wykorzystaliśmy cantilevery *Veeco MLCT E i F.* Z uwagi na wiel-kość skanu, pracowaliśmy przy niskiej częstotliwości skanowania 0.2 *Hz* (optymalne wzmocnienia: $I_{proportional} = 0.3$, $I_{internal} = 0.5$) zbierając 512 punktów w kierunku szybkiego i 256 w kierunku wolnego skanu w przypadku skanów dużych oraz 512×512 punktów w przypadku skanów małego pola.

Wszystkie powierzchnie zostały wcześniej oczyszczone zgodnie z opisem w części 4. Dla każdej próbki zebraliśmy dwa obrazy (*trace* i *retrace*) w 10 losowo wybranych punktach. Otrzymaliśmy więc 20 obrazów, które następnie poddawaliśmy analizie. Wykorzystaliśmy software *WSXM*. Obróbka danych ograniczyła się do odjęcia płaszczyzny, co zniwelowało pochyłość próbki. Pomiary nie były wygładzane, ponieważ zakłóciłoby to informacje o chropowatości.

7.2. Skala $50 \times 50 \ \mu m^2$

Wyniki otrzymane na podstawie analizy skanów zebrane zostały w tabeli 7.1. W kolejnej tabeli (7.2), przedstawiamy wartości otrzymane dla powierzchni nc-TiC/n-C – zostaną one omówione osobno. Obrazy otrzymane na podstawie skanów zamieszczamy w załączniku A.

Analizując otrzymane dane liczbowe zauważamy, że otrzymaliśmy RMS rzędu 20 – 120 nm. Oszacujmy odległość między punktami siatki, z której uzyskaliśmy informację o chropowatości. W kierunku szybkiego skanu, na długości 50 μm zbieraliśmy informacje o wysokości w 512 punktach. Zatem odległość między nimi wynosi $d = 50/512 \approx 100 \ nm$, co jest porównywalne z uzyskiwanym RMS. Dlatego zdecydowaliśmy się powtórzyć pomiary chropowatości wykonując badanie w mniejszej skali $5 \times 5 \ \mu m$ w celu uzyskania informacji z siatki punktów o wyższej gęstości.

	Ti64		Ti67		\mathbf{Pt}
	polerowana	szlifowana	polerowana	szlifowana	
$R_a [nm]$	14.8 ± 0.5	116.2 ± 8.6	42.2 ± 1.4	116.2 ± 8.6	12.2 ± 1.3
$RMS \ [nm]$	20.9 ± 0.6	150.6 ± 10	50.0 ± 1.9	151.0 ± 10	18.3 ± 2.3
R_{sk}	-1.4 ± 0.3	-0.1 ± 0.1	0.2 ± 0.2	-0.1 ± 0.1	0.3 ± 0.9
R_{ku}	13.0 ± 1.8	5.1 ± 0.4	2.5 ± 0.2	5.1 ± 0.4	23.4 ± 7.1

Tab. 7.1. Wyniki otrzymane w wyniku analizy skanów $50 \times 50 \ \mu m^2$ badanych powierzchni.

Odrębnej analizy wymaga informacja o topografii uzyskana dla pojedynczej próbki nc - TiC/n - C. Już obserwacja pod mikroskopem optycznym (por. rys. 5.5) pokazała, że próbka jest niejednorodna. Porównując obrazy z rysunków A.5 i A.6 znajdujące się w załączniku A na stronie 69, zauważamy wyraźną różnice pomiędzy obszarami gładkim i chropowatym. Potwierdzają to wyniki liczbowe zebrane w tabeli 7.2 poniżej, gdzie wszystkie parametry charakteryzujące chropowatość różnią się kilkukrotnie. Chropowata część zawiera wężowate struktury, pod którymi widoczny jest zarys gładkiej powierzchni. Możemy przypuszczać, że struktura ta jest utworzona przez powłokę nc - TiC/n - C o grubości wynoszącej według otrzymanej specyfikacji 290 nm, a gładka część to obserwowane podłoże $Ti67 - O_2$. Za powyższą hipotezą przemawia głębokość rowów obserwowanych na chropowatym fragmencie, która zawiera się w przedziale 150 \div 300 nm.

Tab. 7.2. Wyniki otrzymane na podstawie analizy skanów 50×50 μm^2 powierzchni próbki nc-TiC/a-C.

	Ti64		
	obszar gładki	obszar chropowaty	
$R_a [nm]$	13.4 ± 1.0	67.8 ± 4.2	
$RMS \ [nm]$	7.6 ± 0.6	52.4 ± 3.7	
R_{sk}	4.4 ± 0.3	-1.0 ± 0.1	
R_{ku}	63.3 ± 9.4	5.0 ± 0.3	

7.3. Skala $5 \times 5 \ \mu m^2$

Opracowane wyniki zebraliśmy w tabeli 7.3. Zrezygnowaliśmy z pomiarów dla próbki z powłoką nc-TiC/a-C z uwagi na informacje o niejednorodności opisane w poprzednim podpunkcie.

	Ti64		Ti67		\mathbf{Pt}
	gładka	szorstka	gładka	szorstka	
$R_a \ [nm]$	13.4 ± 1.2	30.1 ± 5.0	7.0 ± 0.7	22.8 ± 3.4	5.1 ± 0.3
$RMS \ [nm]$	19.3 ± 1.4	40.7 ± 7.2	10.1 ± 1.1	35.8 ± 6.1	7.0 ± 0.5
$Avg_h \ [nm]$	152 ± 7	161 ± 33	178 ± 86	144 ± 21	-1.0 ± 0.1
R_{sk}	-1.9 ± 0.1	-1.4 ± 0.7	0.2 ± 0.6	-0.1 ± 0.2	5.3 ± 0.6
R_{ku}	9.0 ± 0.9	19.7 ± 10.9	10.0 ± 1.7	6.9 ± 3.1	

Tab. 7.3. Wyniki otrzymane na podstawie analizy skanów $5 \times 5 \ \mu m^2$ powierzchni tytanu.

8. Zestawienie wyników pomiarów ilościowych

Dla ułatwienia porównania, uzyskane informacje o chropowatości próbek zebraliśmy na wykresach poniżej (rys. 8.1-8.4). Parametry chropowatości wyznaczone na podstawie skanów w mniejszej skali, a wiec efektywnie obliczenia na gestszej siatce punktów, uległy zmniejszeniu w stosunku do pomiarów w większej skali. Zauważmy, że próbki szlifowane nie tylko charakteryzują się większą chropowatością od polerowanych, ale również wartości parametrów R_a i RMS są zbliżone, co jest wynikiem szlifowania papierem ściernym o tej samej gradacji. Wyższe niepewności pomiarowe dla tych powierzchni świadczą o tym, że szlifowanie doprowadziło również do większego rozrzutu parametrów w różnych częściach próbki. Różnica w chropowatości próbek gładkich i chropowatych przekracza 20 nm, co powinno być wystarczające do otrzymania mierzalnej różnicy w liczebności wzrastających komórek, jeśli chropowatość istotnie ma na nią wpływ. Skośność rozkładów wykazywała duże wahania pomiędzy kolejnymi skanami, co objawiło się w relatywnie dużych niepewnościach. Kurtoza dla mniejszych skanów wykazuje podwyższone wahania, co świadczy o powstaniu podczas polerowania niewielkich obszarów nieznacznie różniących się jednorodnością struktury powierzchni.



Rys. 8.1. Zestawienie wartości parametru ${\cal R}_a$ dla badanych powierzchni.



 ${\bf Rys.}$ 8.2. Zestawienie wartości parametruRMSdla badanych powierzchni.



Rys. 8.3. Zestawienie wartości parametru ${\cal R}_{sk}$ dla badanych powierzchni.



Rys. 8.4. Zestawienie wartości parametru R_{ku} dla badanych powierzchni.

Część IV

Hodowla fibroblastów na badanych powierzchniach

1. Zależność liczebności komórek od czasu inkubacji

1.1. Metodyka pracy

Czynności opisane poniżej mają na celu zapewnienie powtarzalnych warunków do wzrostu komórek na badanych powierzchniach oraz oceny ich liczebności przy wykorzystaniu komory Bürkera. W tej części badań, do próbek analizowanych wcześniej zdecydowaliśmy się dodać powierzchnię kontrolną – polistyren. Próbkę tą stanowił fragment sterylnego naczynia, w którym hodowano komórki.

1.2. Badanie liczebności komórek na powierzchni

Naszym celem było określenie liczebności komórek dla różnych czasów inkubacji. Wszystkie opisane niżej czynności wykonywaliśmy w sterylnych warunkach pod komorą laminarną (wyłączając zliczanie komórek, które odbywało się pod mikroskopem optycznym w powietrzu). Przyjęliśmy następującą procedurę:

- 1. **Przygotowanie powierzchni** Każdorazowo wszystkie próbki były czyszczone zgodnie z procedura opisaną w części 4 na stronie 29. Następnie próbki umieszczaliśmy w naczyniach 12 dołkowych (pole powierzchni dołka: $3.8 \ cm^2$, pojemność dołka: $6 \ ml$), po jednej próbce w dołku.
- 2. Przygotowanie komórek w stężeniu 10⁵ komórek na dołek Rozpoczynaliśmy od zliczenia komórek w zawiesinie powstałej po rozpuszczeniu peletki uzyskanej po odwirowaniu komórek trypsynowanych z naczynia hodowlanego inkubowanego przez kilka dób. Pożądaną liczbę komórek (równą liczbie wykorzystanych dołków ·10⁵) zawieszaliśmy w pożywce zawierającej 20% surowicy, 80% DMEM oraz chemioterapeutyk cyprofloxacynę w stężeniu 50 µl/100 ml. Następnie każdy dołek wypełnialiśmy objętością 3 ml przygotowanego roztworu.
- 3. Inkubacja Naczynie dołkowe z próbkami umieszczaliśmy w inkubatorze. Pozostawało tam ono w warunkach ustalonej temperatury, wilgotności i stężenia CO₂ przez ustalony czas inkubacji, podczas którego komórki mogły swobodnie adherować i wzrastać na powierzchniach. W razie konieczności (zmiana barwy

pożywki w wyniku wydzielonych produktów przemiany materii), wymieniano pożywkę w dołkach na świeżą o takim samym składzie jak pierwotnie, w objętości 3 ml na dołek.

- 4. **Przygotowanie komórek do zliczania** Po upłynięciu pożądanego czasu inkubacji, za pomocą pęsety próbki przenoszono z dołków hodowlanych do sterylnych probówek, gdzie zalewano je 1.5 ml trypsyny i pozostawiano w inkubatorze na 4 min. Następnie każdą probówkę umieszczano na mieszadle typu vortex w celu oderwania komórek od powierzchni. Próbki usuwano z probówek, a trypsynę z zawieszonymi komórkami przenoszono do probówek Eppendorfa i wirowano przez 6 minut przy prędkości 1200 obrotów na minutę. Następnie odciągano supernatant i rozpuszczano peletkę w żądanej objętości DMEM $(0.1 1 \ ml \ w \ zależności \ od prognozowanej na podstawie rozmiaru peletki liczby komórek).$
- 5. Zliczanie komórek Zawiesinę znajdującą się w probówce Eppendorfa umieszczano tuż przed zliczaniem na 30 s w mieszadle typu vortex. Następnie, mieszając dodatkowo poprzez kilkukrotne pipetowanie w dół i w górę (ang. trituration), dwukrotnie pobierano 20 μl zawiesiny i umieszczano ją w komorze Bürkera na obu siatkach. Zliczano komórki w 6 dużych kwadratach każdej z siatek. Otrzymywano stąd 12 wyników liczbowych które następnie uśredniano, za niepewność uznając odchylenie standardowe średniej. Pomiar powtarzano dla każdej probówki Eppendorfa.

Opisane wyżej kroki powtarzane były dla każdego czasu inkubacji.

1.3. Wyznaczenie pola powierzchni próbek

Badane próbki różniły się polem powierzchni dostępnym dla wzrastających komórek. W związku z tym, w celu porównania uzyskanych wyników pomiarów liczebności, otrzymane wyniki należy odnieść do jednostki powierzchni.

1.3.1. Metoda wyznaczania pola powierzchni

W celu precyzyjnego wyznaczenia pola powierzchni zdecydowaliśmy się na metodę optyczną:

• Próbki układamy na papierze milimetrowym i oświetlamy równomiernie rozproszonym światłem. Następnie wykonujemy zdjęcie ze statywu umieszczonego pionowo nad próbkami w odległości metra w celu zminimalizowania zniekształceń wprowadzanych przez optykę aparatu.



Rys. 1.1. Próbki rozmieszczone na papierze milimetrowym przed wykonaniem fotografii służącej do wyznaczenia pola ich powierzchni.

- Z otrzymanego zdjęcia przy użyciu programu do obróbki graficznej (*Corel PhotoPaint X4*) wyodrębniamy do osobnego pliku każdą z próbek w postaci bitmapy czarno-białej. Reprezentuje ona kwadratową tablicę pikseli, w której 1 odpowiada białemu tłu, natomiast 0 odpowiada pikselowi znajdującemu się w miejscu próbki. Dodatkowo do kalibracji przygotowujemy pliki zawierające kwadrat zaczernionych pikseli odpowiadający polu 5 × 5 mm na papierze milimetrowym oraz obraz zawierający jedynie obwódkę tego kwadratu o szerokości linii siatki.
- Wykorzystując środowisko *Wolfram Mathematica 6.0* napisaliśmy skrypt zliczający piksele znajdujące się w obszarze próbki (piksele zaczernione).

```
1 IlePixeli[nazwapliku_]:= Module[{obrazek,rozmiary,
poleObrazka,zliczone},
```

- 2 (*Wczytuję obrazek i~konwertuję go: 0 czarny, 1 biały*)
- ³ obrazek=Binarize [**Import** [nazwapliku]];
- $_{4} | (*Obliczam \ pole \ obrazka = wysokość * szerokość *)$

```
<sup>5</sup> rozmiary = ImageDimensions[obrazek];
```

```
<sup>6</sup> poleObrazka=rozmiary [[1]] * rozmiary [[2]];
```

```
7 | zliczone = Total [ Total [ ImageData [ obrazek ] ] ];
```

8 poleObrazka-zliczone

```
9 ];
```

10

- 11 IlePixeli ["kratka5x5mm.bmp"]
- 12 6480
- Posiadając informacje o liczbie piksel
i ${\cal P}_{px}$ zajmowanych przez każdą z próbek

i znając liczbę pikseli P_5 kwadratu $P_{\Box} = 5 \times 5 \ mm^2$ możemy dokonać konwersji i wyrazić pole powierzchni próbek w milimetrach kwadratowych:

$$P = \frac{P_{px}}{P_5} P_{\Box} \tag{1.1}$$

1.3.2. Szacowanie niepewności

W celu oszacowania niepewności wyznaczenia pola powierzchni próbek wykorzystamy informację o polu kwadratu siatki oraz o liczbie pikseli zajmowanych przez linie wyznaczające ten kwadrat. Dla ustalenia uwagi, przyjmijmy oznaczenia jak na rysunku 1.3. Wówczas pole P_5 [px] kwadratu 5 × 5 mm² możemy zapisać:

$$P_5 = a^2 \tag{1.2}$$

Pole $P_{err} [px]$ zajmowane przez otoczkę powstającą z linii ograniczających kwadrat wyniesie wówczas:

$$P_{err} = b^2 - a^2$$

Niepewność pomiaru długości boku kwadratu wynosi $\delta a = 2(b - a)$, stąd:

$$\delta P = \frac{\partial P}{\partial a} \delta a. \tag{1.3}$$

Składając powyższe wzory, obliczmy:

$$P_{err} = b^2 - a^2 = (b - a)[2a + (b - a)] \stackrel{|\xi = b - a|}{=} \xi[2\sqrt{P} + \xi]$$
(1.4)

Rozwiązując powyższe równanie kwadratowe ze względu na ξ , otrzymujemy:

$$\xi = \sqrt{a^2 + P_{err}} - a,$$

a stąd niepewność pomiaru długości:

$$\delta a = 2\xi = 2\left(\sqrt{a^2 + P_{err}} - a\right). \tag{1.5}$$

Obliczając na tej podstawie niepewność wyznaczenia pola P_5 z (1.2) i (1.3) dostaniemy:

$$\delta P_5 = a_5 \delta a_5 = 2\sqrt{P_5} \left(\sqrt{P_5 + P_{err}} - \sqrt{P_5}\right),$$
 (1.6)



Rys. 1.2. Schemat postępowania przy wyznaczaniu pola powierzchni badanej próbki.

co po podstawieniu wartości $P_5 [px]$ i $P_{err} [px]$ daje:

$$\frac{\delta P_5}{P_5} = 5,8\%$$

Pozostaje jeszcze wyznaczyć niepewność zliczenia pikseli δP_{px} zajmowanych przez dużą próbkę. Zakładamy, że wykrywając krawędź możemy popełnić błąd $r_w \pm 1 px$, gdzie r_w to promień wodzący. Stąd niepewność możemy oszacować poprzez obwód okręgu o polu równym P_{px} . Stąd:

$$\delta P_{px} = \frac{2\sqrt{P_{px}}}{\sqrt{3}}$$

Wówczas niepewność wartości po konwersji pola (1.1) na jednostki metryczne możemy wyrazić:

$$\delta P = \frac{1}{\sqrt{3}} \sqrt{\left(\frac{P}{P_{px}} 2\sqrt{P_{px}}\right)^2 + \left(\frac{P}{P_5} \delta P_5\right)^2}.$$
(1.7)

1.3.3. Wyniki

Pola próbek wraz z niepewnościami wyrażone w jednostkach metrycznych zebrano w tabeli 1.1. Zauważmy, że próbki stopów tytanu mają w granicach niepewności pomiarowej takie same pola, natomiast próbka platyny i próbka kontrolna wykonana z polistyrenu mają pola mniejsze.



Rys. 1.3. Kwadrat $5 \times 5 \ mm^2$ służący do kalibracji i wyznaczenia niepewności. Oznaczenia: a – długość boku kwadratu (wewnętrzna) [px], b – zewnętrzna długość boku [px].

Tab. 1.1. Pola powierzchni badanych próbek.

Próbka	Pole powierzchni [mm ²]
Ti64 polerowana	$88 \pm 3,1$
Ti64 szlifowana	$88 \pm 3,1$
Ti67 polerowana	$85\pm2{,}9$
Ti67 szlifowana	$86 \pm 3,0$
platyna	$39 \pm 1,4$
polistyren	$63 \pm 2,2$

1.4. Wyniki

Zbadaliśmy liczebność komórek na wszystkich powierzchniach dla 3 wybranych czasów inkubacji: 55h, 88h i 114h. Opracowane wyniki zestawiliśmy na wykresie znajdującym się na rysunku 1.4 poniżej.



Rys. 1.4. Zestawienie liczebności komórek na jednostkę powierzchni próbki dla 3 czasów inkubacji.

1.5. Obserwacje

Zauważmy, że liczebność komórek rośnie wraz z czasem inkubacji. Odnosząc otrzymane wyniki do krzywej wzrostu fibroblastów na rysunku 2.3 (str. 12) możemy stwierdzić, że pomiędzy drugim (88h) a trzecim (114h) punktem hodowla powinna wejść w fazę logarytmicznego wzrostu, co objawiło się znacznie większym przyrostem liczby komórek niż pomiędzy punktem pierwszym (50h) a drugim. Wskazuje się jednak, że wzrastająca liczba komórek prowadzi do zmniejszenia ich związania do podłoża [10]. Badania Derhami *et al.* pokazują, że podczas *testu centryfugalnego* polegającego na wirowaniu próbek zawierających wzrastające komórki przez określony czas z zadanym przyśpieszeniem stycznym do powierzchni, spada przyczepność komórek. Po jednym dniu hodowli jedynie 15% komórek zostaje odczepionych, po 3 dniach liczba ta wzrasta do 75%, by po 5 dniach wzrosnąć do 90% (przy czym zjawisko to zaobserwowano jedynie dla fibroblastów wzrastających na powierzchni tytanu technicznego, na polistyrenie procent odczepianych komórek był względnie stały niezależnie od czasu hodowli, przynajmniej dla pierwszych 5 dni.

2. Obserwacja pod mikroskopem optycznym

Hodowla dołkowa została przygotowana identycznie jak do badania liczebności (opis w części 1.2 na stronie 42). Po 72 godzinach inkubacji próbki zostały umieszczone pod mikroskopem optycznym (skala na rysunkach).



(a) Polerowana próbka Ti64

(b) Szlifowana próbka Ti64

Rys. 2.1. Fibroblasty wzrastające na powierzchni Ti64 polerowanej i szlifowanej (obrazy z mikroskopu optycznego).

Powyższe obrazy (rys. 2.1) przedstawiają komórki wzrastające na powierzchni Ti64 polerowanej oraz szlifowanej. Pośród słabo związanych, okrągłych komórek, możemy zauważyć związane fibroblasty o wydłużonym, wrzecionowatym kształcie. Powierzchnia o większej chropowatości wykazuje gorszy kontrast do obserwacji komórek.



(a) Polerowana próbka Ti67 (b) Polerowana próbka Ti67



Na obrazach powierzchni Ti67 (rys. 2.2) możemy zauważyć charakterystyczne dla fibroblastów grupowanie się komórek. Porównując zdjęcia na rysunku 2.3 poniżej i biorąc pod uwagę poprzednie obrazy stwierdzamy, że na powierzchni Ti67 obecnych jest więcej fibroblastów o wrzecionowatym kształcie. Ponadto są one silniej wydłużone i bardziej rozgałęzione. Świadczy to o lepszym związaniu komórek do powierzchni Ti67.



 (a) Polerowana próbka Ti64 – wysychająca powierzchnia

(b) Polerowana próbka Ti67

Rys. 2.3. Fibroblasty wzrastające na polerowanych powierzchniach Ti64 i Ti67 (obrazy z mikroskopu optycznego).

Zdjęcie na rysunku 2.3a zostało otrzymane nieumyślnie podczas zbyt długiego przebywania próbki pod mikroskopem. W wyniku osuszenia powierzchni, kontrast

obrazu zwiększył się wyraźnie. Chwilę później komórki obumierając zupełnie zmieniły swój kształt.

3. Obrazowanie Mikroskopem Sił Atomowych

3.1. Metoda badawcza

Próbki przygotowano do obrazowania identycznie jak do badania liczebności (opis w części 1.2 na stronie 42) i inkubowano przez 3 doby. Następnie próbkę umocowywano na skanerze i prowadzono pomiar w kropli buforu DPBS w komórce cieczowej. W wyniku zbyt słabego związania komórek, mimo wielokrotnych prób nie udało się zobrazować fibroblastów w modzie dziobiącym w cieczy. Cantilever RTESP okazał się za twardy, sukcesu nie udało się osiągnąć z wykorzystaniem ostrzy cantilevera MLCT.

3.1.1. Unieruchomienie komórek

W wyniku niepowodzenia w pracy w modzie dziobiącym, ostatecznie zdecydowaliśmy się zobrazować komórki po wcześniejszym unieruchomieniu na powierzchni wykorzystując popularnie używany w tym celu aldehyd glutarowy. Związanie komórek odbywało się poprzez naniesienie na powierzchnię próbek (po ich wcześniejszym przemyciu buforem DPBS) kilku kropel aldehydu glutarowego 0.5% na okres 2 min. Po tym czasie próbki zostały ponownie przemyte DPBSem. Tak spreparowane próbki były obrazowane w modzie kontaktowym wykorzystując cantilever MLCT-C.

3.2. Obrazy fibroblastów

Skany zbierano z największego dostępnego dla wykorzystanego skanera zakresu 53 × 53 $\mu m.$ Obserwacje i komentarze do uzyskanych obrazów znajdują się pod rysunkami 3.1-3.6



Rys. 3.1. Pojedynczy fibroblast na powierzchni polerowanej Ti64. Zwróćmy uwagę na ruch związanego do podłoża fibroblastu ukazujący się jako różnica pomiędzy obrazami *trace* i *retrace*. Wyraźny kontur komórki i struktura powierzchni widoczne są na obrazie powstałym w wyniku rejestracji sygnału błędu.



Rys. 3.2. Okrągła, pierwotnie niezwiązana komórka, związana do powierzchni w wyniku aplikacji aldehydu glutarowego obserwowana na próbce polerowanego Ti64.



Rys. 3.3. Obraz i przekrój pojedynczej komórki zaobserwowanej na powierzchni polerowanego Ti64.



Rys. 3.4. Obraz i przekrój warstwy komórek związanej do powierzchni szlifowanego Ti64.



Rys. 3.5. Wielowarstwowa struktura wzrastających komórek fibroblastów na powierzchni szlifowanego Ti67.



 (a) Pierwotny obraz topografii po-(b) Profil skanu wzdłuż linii zaznawierzchni.
 czonych w 3.6a.



Rys. 3.6. Podczas obrazowania komórek nagromadzonych warstwami, mogliśmy zauważyć ich przemieszczanie się pod wpływem skanującego w modzie kontaktowym ostrza. Różnica ta zademonstrowana jest na powyższych rysunkach, gdzie część komórek z dolnych warstw przy przejściu do mniejszego pola skanowania zostaje rozsunięta (powierzchnia szlifowanego Ti67).

3.3. Obserwacje

Na powierzchni wszystkich badanych próbek obserwujemy fibroblasty o wydłużonym kształcie, co świadczy o ich związaniu z powierzchnią. Komórki mają tendencję do gromadzenia się w klastrach o dużym zagęszczeniu i wielowarstwowej strukturze. Z uwagi na duże rozmiary komórek: szerokość dochodzącą do 10 μm i długość przekraczającą często 25 μm , niestety nie jesteśmy w stanie obiektywnie ocenić gęstości pokrycia przy użyciu wykorzystywanego mikroskopu sił atomowych.

Analizując wszystkie uzyskane obrazy i obserwacje pokrycia w kontrolnym mikroskopie optycznym będącym częścią mikroskopu sił atomowych stwierdzamy, że:

• próbki ze stopu Ti67 zawierają więcej komórek związanych niż próbki Ti64,

- komórki tworzą kilkuwarstwowe skupiska,
- obserwujemy obszary zawierające dobrze rozwinięte komórki charakteryzujące się znacznie wydłużonym kształtem, łączące się między sobą za pośrednictwem długich wypustek,
- na powierzchni tytanu wokół dobrze związanych komórek obserwujemy znaczną ilość substancji międzykomórkowej o wysokości dochodzącej do 1.5 μm wydzielonej szczególnie wokół zgrubienia zawierającego jądro (por. rys. 3.3),
- komórki mają wysokość ok. 6 μm w zgrubieniu zawierającym jądra oraz ok. 4 μm poza nim.

Część V

Podsumowanie

1. Interpretacja wyników i wnioski

1.1. Analiza niepewności

Przyjęta metoda zliczania komórek (manualna w komorze Bürkera) i fakt, że dysponowaliśmy jedynie po jednej sztuce próbki danej powierzchni, niedopasowanej dodatkowo do rozmiarów dołka, ma wpływ na zwiększoną niepewność pomiarową. Każdorazowe zliczenie komórek wiązało się z koniecznością ponownego czyszczenia powierzchni i rozpoczęcia hodowli na powierzchniach od początku. Stąd komórki dla kolejnych czasów inkubacji pochodzą z różnych pasaży (ale z tego samego dla ustalonego czasu inkubacji). Dodatkową niepewność wprowadzała konieczność odmierzania stałego stężenia początkowego komórek (10⁵ komórek na dołek) dla wszystkich pomiarów zliczania. obiektywne odniesienie wyników otrzymanych dla próbki Ti67O₂ z powłoką nc-TiC/a-C do typu podłoża czy jego chropowatości jest niemożliwe z uwagi na niejednorodność próbki wykrytą i opisaną w części 7.2.

1.2. Analiza statystyczna

W celu określenia związków pomiędzy zbadanymi parametrami powierzchni a liczebnością, konieczne jest zastosowanie odpowiedniej analizy statystycznej. Podobnie jak w [25], wykorzystaliśmy dwuczynnikową analizę wariancji (ANOVA) do ustalenia statystycznej zależności pomiędzy zmienną zależną – liczebnością a zmiennymi kontrolowanymi: czasem inkubacji, materiałem podłoża, chropowatością i kątem zwilżania. Do obliczeń wykorzystano pakiet skryptów Java *Statlets* (1997, NWP Associates, Inc., www.mrs.umn.edu/~sungurea/statlets/statlets.htm). Przykładową tabelę analizy wariancji przedstawia tab. 1.1. Zakładając poziom istotności p =0.05, na podstawie testów otrzymujemy:

Czas inkubacji ma statystycznie znaczący wpływ na liczebność komórek.

- **Rodzaj podłoża** (bez rozróżniania chropowatości) ma statystycznie znaczący wpływ na liczebność komórek.
- Interakcja między czasem inkubacji a rodzajem podłoża ma statystycznie znaczący wpływ na liczebność komórek. Wskazuje to na fakt, że wpływ rodzaju podłoża na liczebność komórek zależy od czasu inkubacji.

Tab. 1.1. Dwuczynnikowa analiza wariancji. Zmienna zależna: liczebność, zmienne kontrolowane: czas inkubacji i materiał podłoża. Przyjmując poziom istotności p = 0,05 otrzymujemy potwierdzenie, że zmienne kontrolowane mają statystyczny wpływ na zmienną zależną.

	Suma kwa-	Liczba	Wariancja Statystyka		Graniczny
	dratów	stopni		\mathbf{F}	poziom
		swobody			istotności
Materiał pod-	20.9831	4	5.24576	6.56	0.0222
łoża					
Czas inkubacji	245.778	2	122.889	153.60	0.0004
Interakcja	57.0472	8	7.13091	8.91	0.0078
Rezydua	4.80025	6	0.800042		
Całkowita	328.608				
(corr.)					

Chropowatość podłoża nie ma statystycznie znaczącego wpływu na liczebność komórek.

Kąt zwilżania nie ma statystycznie znaczącego wpływu na liczebność komórek.

1.3. Wnioski

Analiza statystyczna wpływu mierzonych parametrów na liczebność komórek fibroblastów pokazała szereg interesujących zależności. Zgodnie z intuicją, wraz z wydłużeniem czasu inkubacji rośnie liczebność komórek na powierzchni, co potwierdza opisana krzywa wzrostu (patrz część 2.2.1 na stronie 12). Liczebność nie wykazuje korelacji z wyznaczoną w dwóch skalach chropowatością powierzchni. Wyniki te potwierdzają badania J. Martin et al., S. Affrossman et al. i M. J. Dalbs et al., w których autorzy pokazują, że chropowatość wpływa na proliferację i adhezję komórek w znacznie mniejszym stopniu niż budowa i skład chemiczny powierzchni [29–31]. Podobnie kąt zwilżania nie wykazuje znaczącego statystycznie wpływu na liczebność. Obserwując znaczną różnicę między kątem zwilżania dla polistyrenu i powierzchni tytanu oraz badania nad adhezją fibroblastów do wymienionych powierzchni [10] wydaje się, że parametr ten jest raczej skorelowany z siłą adhezji komórek do powierzchni. Zależność od rodzaju podłoża wykazała statystyczny wpływ na liczebność. Analizując zależności uzyskane w części 1.3.3 (str. 46) oraz obrazy optyczne i AFM obrazów na powierzchniach, zaobserwować możemy pewne prawidłowości. Komórki wzrastające na platynie wykazują znaczący skok w liczebności pomiędzy 88 a 114 godzinami hodowli. Pokrywa się to z obserwacjami poczynionymi przez Kallmes *et al.* [32], jednakże tam gwałtowny wzrost liczebności obserwowany był na wcześniejszym etapie hodowli. Różnica może jednak być wytłumaczona innymi warunkami hodowli. Hodowla na próbce Ti67O₂ w powłoce nc-TiC/a-C przedstawia obiecujące rezultaty. Jednakże z uwagi na niejednorodność powierzchni i przypuszczalną degradację powłoki, wyników tych nie można przypisać jednoznacznie do podłoża lub wierzchniej warstwy. Ti64 i Ti67 wykazują podobne warunki do wzrostu komórek. Przypuszczamy, że w skali czasowej eksperymentu migracja toksycznych jonów wanadu z Ti64 poprzez zjawiska korozji powierzchni nie była obserwowana. Obrazy z mikroskopu optycznego wykazują nieznaczne różnice w sposobie adhezji komórek na korzyść Ti67 – fibroblasty wykazują większą asymetrię kształtu i bardziej rozbudowane wypustki. W celu potwierdzenia przypuszczenia, konieczne są dalsze badania i pomiar adhezji komórek do powierzchni w zależności od czasu inkubacji.

2. Streszczenie pracy

Poszukiwanie materiałów mogących być z powodzeniem stosowanych w implantach stawowych jest zagadnieniem złożonym. Oprócz kryteriów związanych z ich mechaniczną pracą, takich jak wytrzymałość na zerwanie, zmęczeniowa, odporność na ścieranie i degradację (korozję), muszą one wykazywać wysoką kompatybilność z otaczającymi żywymi tkankami. Badania biokompatybilności na dużą skalę stały się możliwe dzięki umożliwieniu hodowli żywych komórek in vitro. Dzięki temu uzyskano wydajne narzędzie otwierające drogę do weryfikacji cytotoksyczności, krzywych wzrostu i adhezji komórek stanowiących bezpośrednie otoczenie badanego biomateriału w docelowej lokalizacji w organiźmie żywym.

Stopy tytanu stanowią obiecującą klasę materiałów do omawianych zastosowań. W pracy wykorzystaliśmy stop stosowany wcześniej w przemyśle aeronautycznym Ti-6Al-4V, a także materiał odkryty później w wyniku podejrzewanego toksycznego wpływu wanadau, Ti-6Al-7Nb oraz jego modyfikację Ti-6Al-7Nb-O₂ z 290 nm powłoką amorficznego węgla z 2 - 5 nm nanokrystalitami TiC. Parzyste próbki Ti64 i Ti67 zostały zróżnicowane ze względu na teksturę podłoża przez szlifowanie papierem ściernym o gradacji 1200. Dla porównania przyjęliśmy polerowaną pastą o ziarnie $0.25\mu m$ platynę oraz polistyren, stosowany powszechnie do produkcji naczyń przeznaczonych do hodowli komórkowej.

Badane próbki zostały scharakteryzowane pod względem optycznej oceny zanieczyszczeń, chropowatości oraz kata zwilżania. Zanieczyszczenia obserwowane pod mikroskopem optycznym pokazały konieczność opracowania wydajnej metody czyszczenia. Ostatecznie przyjęliśmy procedurę Brånemark przygotowania próbek przeznaczonych do badań z udziałem żywych komórek. Pomiary kąta zwilżania przeprowadzono dla ultraczystej wody oraz buforu soli fizjologicznych DPBS. Wykazały one słabą zależność od chropowatości powierzchni. Ponadto, dla pomiarów z użyciem wody, dla wszystkich próbek metalicznych uzyskano kąt zwilżania z przedziału $50-60^\circ$, w odróżnieniu od polistyrenu, dla którego uzyskano kąt zbliżony do prostego, oraz szkła, gdzie kat był wyraźnie mniejszy od 40°. Chropowatość została wyznaczona na podstawie badań topografii Mikroskopem Sił Atomowych w modzie kontaktowym w skali $50 \times 50 \ \mu m^2$ oraz $5 \times 5 \ \mu m^2$. Pokazały one zbliżoną chropowatość dla próbek szlifowanych. W mniejszej skali, dla próbek polerowanych i polistyrenu otrzymaliśmy RMS poniżej 20 nm. Obserwacja próbki nc-TiC/a-C@Ti67O₂ pokazała znaczną niejednorodność, prawdopodobnie związaną z degradacją części powłoki.

Badania z udziałem żywych komórek rozpoczęliśmy od praktycznego opanowania metodyki hodowli komórkowej. Komórki fibroblastów ludzkich linii HS5 hodowane były na badanych powierzchniach w płytkach 12 dołkowych w 3 ml podłoża zawierającego 80% pożywki DMEM, 20% surowicy FBS oraz 0.5‰chemioterapeutyku

ciprofloxaciny chroniącym przed zakażeniem mykoplazmami. W każdym dołku znajdowała się jedna próbka z początkową liczbą $1 \cdot 10^5$ komórek. Powierzchnie z wzrastającymi komórkami zostały zbadane pod mikroskopem optycznym oraz, po utrwaleniu aldehydem glutarowym, w komórce cieczowej Mikroskopu Sił Atomowych w modzie kontaktowym. Liczebność komórek szacowana była przy pomocy manualnego hemocytometru (komora Bürkera) po 55, 88 i 114 godzinach inkubacji w 37°C przy 6% CO₂ i stałej wilgotności.

Analiza statystyczna parametrów wpływających na liczebność komórek pokazała jej zależność od czasu inkubacji i rodzaju podłoża oraz statystyczny brak wpływu chropowatości powierzchni oraz kąta zwilżania, co znalazło potwierdzenie w wynikach podobnych badań przedstawianych w literaturze. Nie zaobserwowano cytotoksycznego działania wanadu zawartego w stopie Ti64, prawdopodobnie wskutek zbyt małej skali czasowej obserwacji, w której procesy korozji uwalniającej toksycznej jony miały zaniedbywalny wpływ. Obserwacja optyczna pokazała, że fibroblasty wzrastające na powierzchni Ti67 są bardziej wydłużone, a ich wypustki lepiej rozbudowane. Pozwala to wysunąć przypuszczenie, że adhezja fibroblastów do powierzchni Ti67 jest lepsza niż do Ti64, jednakże potwierdzenie tego faktu wymaga dalszych badań. Znaczna degradacja powierzchni próbki nc-TiC/a-C@Ti67O₂ uniemożliwia interpretację obiecujących wyników hodowli.

Słowa kluczowe: biomateriały, implanty stawowe, stopy tytanu Ti 64 i Ti67, analiza chropowatości, AFM, warunki hodowli komórek, zliczanie komórek, fibroblasty

Literatura

- D. F. Williams. Definitions in Biomaterials. Progres in Biomedical Engineering. Elsevier, New York, 1987.
- [2] M. F. Semlitsch et al. Joint replacement components made of hot-forged and surface-treated ti-6al-7nb alloy. *Biomater*, 13(11):781–8, 1992.
- [3] K. H. Borowy et al. On the properties of a new titanium alloy (tial5fe2.5) as implant material. *Titanium'84 Science and Technology*, 2:1381–6, 1995.
- [4] SG. Steinemann. Corrosion of titanium and titanium alloys for surgical implants. *Titanium 84' Science ane Technology*, 2:1373–9, 1985.
- [5] Silver FH et al. Viscoelastic properties of young and old human dermis: A proposed molecular mechanism for elastic energy storage in collagen and elastin. J Applied Polymer Science, 86:1978–1985, 2002.
- [6] Benjamin Loret and Jacques M. Huyghe. Chemo-Mechanical Couplings in Porous Media Geomechanics and Biomechanics. CISM International Centre for Mechanical Sciences, 2004.
- [7] University of Illinois at Urbana-Champaign College of Medicine at Urbana-Champaign. Histology atlas. online. https://histo.life.illinois.edu/histo/atlas.
- [8] Smith et al. Human orbital fibroblasts in culture bind and respond to endothelin, 1997.
- [9] Olympus Micrscopy Resource Center. http://www.olympusmicro.com/ galleries/abramowitz/pages/3t3cells1small.html.
- [10] Kalal Derhami et al. Quantifying the adherence of fibroblasts to titanium and its enhancement by substrate-attached material. John Wiley&Sons, pages 315– 322, 2000.
- [11] Y. Oshikane et al. Observation of nanostructure by scanning near-field optical microscope with small sphere probe. Sci. Technol. Adv. Mater., 8(181), 2007.
- [12] Martin Fleischmann and Stanley Pons. Electrochemically induced nuclear fusion of deuterium. Journal of Electroanalytical Chemistry, 261(2, Part 1):301 308, 1989. ISSN 0022-0728.
- [13] M. Fleischmann, P.J. Hendra, and A.J. McQuillan. Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode. *Chemical Physics Letters*, 26(2):163 – 166, 1974. ISSN 0009-2614.

- [14] R. M. Stöckle, Y. D. Suh, V. Deckerd, and R. Zenobi. Nanoscale chemical analysis by tip-enhanced raman spectroscopy. *Chemical Physics Letters*, 318 (1-3):131–136, 2000.
- [15] I.N. Sneddon. The relation between load and penetration in the axisymmetric boussinesq problem for a punch of orbitrary profile. Int. Journal of Engineering Science, 47(3), 1965.
- E. Evans and K. Ritchie. Dynamic strength of molecular adhesion bonds. *Bio-physical Journal*, 72(4):1541 1555, 1997. ISSN 0006-3495. doi: DOI:10.1016/S0006-3495(97)78802-7. URL http://www.sciencedirect.com/science/article/B94RW-4V8X9MJ-3/2/35c90145d392d138aa0b77fc2f13a362.
- [17] P.E. Hillner, D.A. Walters, R. Lal, H.G. Hansma, and RK. Hansma. Combined atomic force and confocal laser scanning microscope. *Microscopy and Microanalysis*, 1(03):127-130, 1995. doi: 10.1017/S1431927695111277. URL http://journals.cambridge.org/action/displayAbstract?fromPage= online&aid=167711&fulltextType=RA&fileId=S1431927695111277.
- [18] S. Akamine and H. Yamada. US Patent, (5,489,774), 1996.
- [19] T. Schmid et al. Towards chemical analysis of nanostructures in biofilms i: imaging of biological nanostructures. Anal Bioanal Chem, (391):1899–1905, 2008.
- [20] T. Schmid et al. Towards chemical analysis of nanostructures in biofilms ii: tip-enhanced raman spectroscopy of alginates. Anal Bioanal Chem, (391):1907– 1916, 2008.
- [21] T. Deckert-Gaudig, E. Bailo, and V. Deckert. Perspectives for spatially resolved molecular spectroscopy – raman on the nanometer scale. J. Biophoton, 1(5): 377–389, 2008.
- [22] U. U. Neugebauer, P. Rösch, M. Schmitt, J. Popp, C. Julien, A. A. Rasmussen, C. Budich, and V. Deckert. On the way to nanometer-sized information of the bacterial surface by tip-enhanced raman spectroscopy. *ChemPhysChem*, 7(7): 1428–1430, 2006.
- [23] M. Long and H.J. Rack. Titanium alloys in total joint replacement a materials science perspective. *Biomaterials*, 19:1621–1639, 1998.
- [24] Elena P. Ivanova et al. Impact of nanoscale roughness of titanium thin film surfaces on bacterial retention. *Langmuir*, 26(3):1973–1982, 2010.

- [25] D. Osian Meredith et al. Human fibroblast reactions to standard and electropolished titanium and ti-6al7nb, and electropolished stainless stell. Wiley *Periodicals*, pages 541–555, 2005.
- [26] Garcia LT. Hobo S., Ichida E. Osseointegration and occlusal rehabilitation. Chicago: Quintessence, 3:104, 1989.
- [27] NTMDT: NTEGRA platform NTEGRA Spectra. Information brochure. online. http://www.ntmdt.com/data/media/files/products/ntegra/ntegra_ spectra_datasheet.pdf.
- [28] Park Systems Inc. Park xe-120 system information details. online. http: //www.parkafm.com/product/product_view.php?gubun=R&id=61.
- [29] J. Martin et al. Effect on titanium surface roughness on proliferation, differentiation and protein synthesis of human osteoblast-like cells mg-63. J Biomed Meter Res, 29:389–401, 1995.
- [30] S. Affrossman et al. Surface topography and composition of deuterated polystyrene-poly(bromostyrene) belnds. *Macromolecules 29*, 29:5010–5016, 1996.
- [31] M. J. Dalby et al. Rapid fibroblast adhesion to 27nm high polymer demixed nano-topography. *Biomaterials* 25, 25:77–83, 2004.
- [32] D.F. Kallmes et al. In vitro proliferation and adhesion of basic fibroblast growth factor-producing fibroblasts on platinum coils. *Radiology*, 206(1):237–43, 1998.
- [33] Stanisława Stokłosowa. *Hodowla komórek i tkanek*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2004.
- [34] Harry Eagle. The specific amino acid requirements and mammalian cells in tissue culture. J. Biol. Chem., 214:839–845, 1955.
- [35] Anna Wójcicka. Reakcje fibroblastów i osteoblastów z polikaprolaktonem modyfikowanym zmiennym ph., Kraków 2007. Praca magisterska pod opieką dr Barbary Czajkowskiej.
- [36] Bicompare.com DPBS. http://www.biocompare.com/ProductDetails/ 346915/Dulbeccos-Phosphate-Buffered-Saline-DPBS.html.
- [37] Carlroth. http://www.carlroth.pl/media/_pl-pl/Graphics/00001914_0. jpg.
- [38] Wydział Chemiczny Politechniki Gdańskiej Katedra Technologii Leków i Biochemii. Zamrażanie i rozmrażanie komórek eukariotycznych, Gdańsk 2008.

- [39] A.F. Stalder, G. Kulik, D. Sage, L. Barbieri, and P. Hoffmann. A snake-based approach to accurate determination of both contact points and contact angles. *Colloids And Surfaces A: Physicochemical And Engineering Aspects*, 286(1-3): 92–103, September 2006.
- [40] I. Horcas, R. Fernandez, J.M. Gomez-Rodriguez, J. Colchero asn J. Gomez-Herrero, and A. M. Baro. *Rev. Sci. Instrum.*, 013705, 2007.
- [41] G. Binnig, C. F. Quate, and Ch. Gerber. Atomic force microscope. *Physical Review Letters*, 56(9):930–933, 1986.

Spis rysunków

2.1.	Przekrój histologiczny psiego mięśnia poprzecznie prążkowanego	11
2.2.	Komórki linii komórkowej embrionalnych mysich fibroblastów 3T3 [9]	12
2.3.	Krzywa wzrostu komórek fibroblastów na tytanie technicznym (cpTi $% \mathcal{C}$	
	$-\Box$) oraz polistyrenie (TPS $-\triangle$) [10, p. 318]	12
4.1.	Schemat konstrukcji Mikroskopu Sił Atomowych	16
4.2.	Potencjał Lennarda-Jonesa.	16
4.3.	Obraz powierzchni tytanu uzyskany w tappingu w cieczy różnymi	
	ostrzami	19
4.4.	Struktura siatki w komorze Bürkera.	25
4.5.	Budowa komory Bürkera	25
1.1.	Topografia próbki platyny uzyskana przy pomocy Mikroskopu Sił	
	Atomowych w modzie kontaktowym.	27
5.1.	Mikroskop NTEGRA SPECTRA [27]	30
5.2.	Mikroskop Park XE-120 [28]	30
5.3.	Zestawienie obrazów dla Ti64 przy pomocy mikroskopu optycznego	
	NTGRA	32
5.4.	Zestawienie obrazów dla Ti67 przy pomocy mikroskopu optycznego	
	NTGRA	33
5.5.	Zestawienie obrazów dla badanych próbek przy pomocy mikroskopu	
	optycznego systemu Park.	34
6.1.	Ilustracja zjawiska zwilżania na przykładzie kropli cieczy na płaskiej powierzchni	35
69	Conjometr Ramé Hart Model 200 wraz z wykonanym podezas po	00
0.2.	miarów zdieciem kropli wody na powierzchni Ti64.	35
6.3	Zestawienie wyników pomiarów kata zwilżania badanych powierzchni	
0.01	dla dwóch cieczy odniesienia (ultraczystej wody i bufora fizjologicz-	
	nego DPBS).	36
8.1.	Zestawienie wartości parametru R_a dla badanych powierzchni	40
8.2.	Zestawienie wartości parametru RMS dla badanych powierzchni. $\ $.	40
8.3.	Zestawienie wartości parametru R_{sk} dla badanych powierzchni	41
8.4.	Zestawienie wartości parametru R_{ku} dla badanych powierzchni	41
1.1.	Pomiar pola powierzchni próbek.	44
1.2.	Schemat postępowania przy wyznaczaniu pola powierzchni badanej	
	próbki	45

1.3.	Kwadrat $5\times 5\;mm^2$ służący do kalibracji i wyznaczenia niepewności.	46
1.4.	Zestawienie liczebności komórek na jednostkę powierzchni próbki dla 3 czasów inkubacji.	47
2.1.	Fibroblasty wzrastające na powierzchni Ti64 polerowanej i szlifowanej	
	(obrazy z mikroskopu optycznego).	48
2.2.	Fibroblasty wzrastające na powierzchni Ti67 polerowanej i szlifowanej	
	(obrazy z mikroskopu optycznego).	49
2.3.	Fibroblasty wzrastające na polerowanych powierzchniach Ti64 i Ti67	
	(obrazy z mikroskopu optycznego).	49
3.1.	Pojedynczy fibroblast na powierzchni polerowanej Ti64	51
3.2.	Okrągła, pierwotnie niezwiązana komórka, związana do powierzchni w wyniku aplikacji aldehydu glutarowego obserwowana na próbce po-	
	lerowanego Ti64.	51
3.3.	Obraz i przekrój pojedynczej komórki zaobserwowanej na powierzchni	
	polerowanego Ti64	52
3.4.	Obraz i przekrój warstwy komórek związanej do powierzchni szlifo-	* 0
	wanego Ti64	52
3.5.	Wielowarstwowa struktura wzrastających komórek fibroblastów na powierzchni szlifowanego Ti67	53
3.6.	Przemieszczanie się komórek nagromadzonych warstwami podczas ska-	
	nowania	54
A.1.	Topografia próbki polerowanej Ti 64, skan o polu $50\times 50~\mu m^2.~.$	69
A.2.	Topografia próbki szlifowanej Ti 64, skan o polu $50\times 50~\mu m^2.$	70
A.3.	Topografia próbki polerowanej Ti 67, skan o polu $50\times 50~\mu m^2.~.$	70
A.4.	Topografia próbki szlifowanej Ti 67, skan o polu $50\times 50~\mu m^2.$	71
A.5.	Topografia wybranego gładkiego obszaru próbki nc-TiC/a-C, skan o	
	polu $50 \times 50 \ \mu m^2$	71
A.6.	Topografia wybranego chropowatego obszaru próbki nc-TiC/a-C, skan	
	o polu 50 × 50 μm^2	72
A.7.	Topografia próbki Pt, skan o polu $50\times 50~\mu m^2.$	72
A.8.	Topografia próbki polerowanej Ti 64, skan o polu $5\times5~\mu m^2.~\ldots$.	73
A.9.	Topografia próbki szlifowanej Ti64, skan o polu $5\times5~\mu m^2.~\ldots$.	73
A.10	Topografia próbki polerowanej Ti 67, skan o polu 5 × 5 μm^2	74
A.11	Topografia próbki szlifowanej Ti 67, skan o polu 5 × 5 μm^2	74
A.12	Topografia próbki Pt, skan o polu $5 \times 5 \ \mu m^2$	75

Spis tablic

2.1.	Właściwości mechaniczne wybranych stopów wykorzystywanych w im-	
	plantach ortopedycznych [23]	28
7.1.	Wyniki otrzymane w wyniku analizy skanów 50 \times 50 μm^2 badanych	
	powierzchni	38
7.2.	Wyniki otrzymane na podstawie analizy skanów 50 \times 50 μm^2 po-	
	wierzchni próbki nc-TiC/a-C.	38
7.3.	Wyniki otrzymane na podstawie analizy skanów 5×5 μm^2 powierzchni	
	tytanu	39
1.1.	Pola powierzchni badanych próbek	46
1.1.	Dwuczynnikowa analiza wariancji	57

Załączniki

A. Topografia badanych powierzchni

Poniżej przedstawimy topografię badanych powierzchni na podstawie skanów z Mikroskopu Sił Atomowych. Opis techniki i dyskusja uzyskanych wyników znajduje się w części 7.

A.1. Skala $50 \times 50 \ \mu m^2$



Rys. A.1. Topografia próbki polerowanej Ti64, skan o polu $50\times 50~\mu m^2.$



Rys. A.2. Topografia próbki szlifowanej Ti64, skan o polu $50\times 50~\mu m^2.$



Rys. A.3. Topografia próbki polerowanej Ti67, skan o polu $50\times 50~\mu m^2.$



Rys. A.4. Topografia próbki szlifowanej Ti67, skan o polu $50\times 50~\mu m^2.$



Rys. A.5. Topografia wybranego gładkiego obszaru próbki nc-TiC/a-C, skan o polu $50\times50~\mu m^2.$



Rys. A.6. Topografia wybranego chropowatego obszaru próbki nc-TiC/a-C, skan o polu $50\times50~\mu m^2.$



Rys. A.7. Topografia próbki Pt, skan o polu $50\times 50~\mu m^2.$
A.2. Skala $5 \times 5 \ \mu m^2$



Rys. A.8. Topografia próbki polerowanej Ti64, skan o polu $5\times5~\mu m^2.$



Rys. A.9. Topografia próbki szlifowanej Ti64, skan o polu $5\times5~\mu m^2.$



Rys. A.10. Topografia próbki polerowanej Ti
67, skan o polu $5\times5\;\mu m^2.$



Rys. A.11. Topografia próbki szlifowanej Ti
67, skan o polu $5\times5\;\mu m^2.$



Rys. A.12. Topografia próbki Pt, skan o polu $5\times5\;\mu m^2.$

B. Laboratorium hodowli komórkowych

W niniejszym załączniku pragniemy zestawić podstawowe informacje i procedury konieczne do prowadzenia hodowli komórkowych. Podane stężenia i wielkości zoptymalizowane są dla linii *HS5* komórek fibroblastów ludzkich, jednakże metodyka stosuje się do niemalże wszystkich typów komórek adherentnych. Pokrótce przedstawiamy wyposażenie pracowni oraz odczynniki wykorzystywane w hodowli, w dalszej części opisując rutynowe czynności, które związane są z kolejnymi etapami prowadzenia hodowli.

B.1. Wyposażenie pracowni hodowli komórek

Podczas kolejnych etapów hodowli, utrzymanie komórek *in vitro* wymaga zapewnienia warunków umożliwiających ich rozrost i przeżycie, przy równoczesnym uniknięciu zakażenia. W tym celu stosuje się wyspecjalizowane naczynia i urządzenia zapewniające optymalne do wzrostu środowisko, wyposażenie umożliwiające wykonanie procesów niezbędnych podczas komórkowej praktyki laboratoryjnej oraz szeroką gamę środków chemicznych i biochemicznych wywołujących określone reakcje komórek. Poniżej opiszemy pokrótce sprzęt i narzędzia przydatne do hodowli komórek będące na wyposażeniu Pracowni Zakładu Fizyki Nanostruktur i Nanotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie oraz odczynniki wykorzystywane przy hodowli fibroblastów z linii komórkowej HS-5.

B.1.1. Sprzęt

B.1.1.1 Komora laminarna

Do podstawowego wyposażenia laboratorium hodowli należy komora laminarna. Zapewnia ona sterylne warunki pracy dzięki stałemu przepływowi strumienia powietrza. Dostęp do jej wnętrza możliwy jest jedynie przez szczelinę u dołu. Wertykalny strumień filtrowanego powietrza wewnątrz komory ogranicza zagrożenie związane z zakażeniem bakteriami i grzybami zawartymi w niefiltrowanym powietrzu znajdującym się w pomieszczeniu. W laboratorium dysponujemy komorą NuAire A2-425 300E Biological Safety Cabinet Class II.

B.1.1.2 Inkubator CO₂

Rolą inkubatora jest zapewnienie hodowanym komórkom odpowiednich warunków umożliwiających przeżycie i wzrost. Związana z tym jest konieczność kontroli podstawowych parametrów środowiskowych o znaczeniu fizjologicznym: temperatury, wilgotności i stężenia CO_2 . W przypadku większości linii komórkowych wywodzących się ze stałocieplnych organizmów (a więc i HS5), optymalne warunki hodowli zapewnia temperatura 37°
i5% stężenie dwutlenku węgla.

W laboratorium dysponujemy inkubatorem NuAire DH Autoflow CO_2 Air-jacketed Incubator.

B.1.1.3 Wirówka

Wirówka centryfugalna pozwala na rozdzielenie faz różniących się gęstością, w szczególności może być wykorzystana do oddzielenia fazy stałej (komórek) znajdującej się w zawiesinie od składników płynnych (podłoże, trypsyna).

W laboratorium dysponujemy wirówką *Heraeus MegaFuge 16R*. W przypadku fibroblastów, komórki wydzielają się w postaci peletki³ na dnie probówki przy wirowaniu przez 4 minuty z szybkością 1200 obr/min.

B.1.1.4 Mikroskop

Do optycznej kontroli stopnia wzrostu hodowli konieczny jest *mikroskop optyczny w geometrii odwróconej.* Pozwala on na wygodny podgląd komórek adherujących do dna naczynia hodowlanego. Mikroskop taki jest także bardzo pomocny do przeprowadzenia manualnego zliczenia komórek znajdujących się w zadanej objętości metodą hemocytometryczną (np. w *komorze Bürkera*). Zastosowanie mikroskopii optycznej w ocenie struktur biologicznych zostało szerzej opisane w części 4.1 na stronie 13.

B.1.1.5 Chłodziarka i zamrażarka

Z uwagi na konieczność przechowywania w obniżonej temperaturze sporej liczby odczynników i substancji wykorzystywanych w hodowli, chłodziarka i zamrażarka stanowią niezbędne wyposażenie. Oprócz zwykłej chłodziarki, w której panuje temperatura ok. 4°C, część składników (np. surowica) powinna być przechowywana w temperaturze -20°C. Dłuższe przechowywanie komórek wiąże się z koniecznością zapewnienia tzw. *temperatury głębokiego mrożenia* -85°C. Komórki można również przechowywać przez wiele lat umieszczając je w naczyniach Dewara wypełnionych ciekłym azotem.

 $^{^{3}\}mathbf{Peletka}$ to frakcja stała wydzielająca się z wirowanego roztworu na dnie w postaci zbitego osadu.

B.1.1.6 Mieszadło magnetyczne, vortex

W procesie przygotowywania roztworów z substancji będących w stanie stałym a także przy rozcieńczaniu, ważne jest zapewnienie jednorodności końcowego produktu. Stąd po przygotowaniu mieszaniny, wskazane jest użycie mieszadła automatycznego.

Mieszadło typu *vortex* jest pomocne do rozdzielenia agregatów komórek znajdujących się w roztworze. Powinno być w szczególności stosowane przed manualnym zliczaniem komórek – dla zapewnienia poprawności wyniku konieczne jest bowiem, by pobrana z zadanej objętości niewielka próbka (zwykle ułamek mililitra) była reprezentatywna dla całej zawiesiny.

B.1.1.7 Myjka ultradźwiękowa

Laboratoryjna myjka ultradźwiękowa jest bardzo pomocna do czyszczenia (jako jeden z etapów dezynfekcji) metalowych i szklanych narzędzi laboratoryjnych. Dzięki występującemu podczas pracy myjki zjawiska kawitacji, zarówno wewnętrzna jak i zewnętrzna powierzchnia przedmiotów jest czyszczona szybko i dokładnie. Czyszczenie w myjce z wykorzystaniem różnych substancji stanowi również podstawowy element *standardowej procedury Brånemark* – procesu przygotowania elementów i podłoży, które mają być zbadane ze względu na biokompatybilność.

Podczas długotrwałego korzystania z myjki należy wziąć pod uwagę efekt podnoszenia się temperatury roztworu myjącego (wskutek dyssypującej energii drgań). W skrajnych przypadkach może on doprowadzić do modyfikacji czyszczonej powierzchni poprzez zwiększenie podatności na chemiczną reakcję z wykorzystanym do mycia rozpuszczalnikiem.

B.1.1.8 Łaźnia wodna

Łaźnia wodna składa się z naczynia wypełnionego wodą wraz z układem termostatu. Pozwala na równomierne dostarczanie lub odprowadzanie ciepła z umieszczonego w niej naczynia laboratoryjnego aż do temperatury wrzenia wody. Jest wykorzystywana jako jeden z etapów sterylizacji naczyń i przyrządów laboratoryjnych. Może być również użyta do inaktywacji surowicy przeznaczonej do hodowli komórkowych.

B.1.1.9 Lampa UV

Światło ultrafioletowe jest powszechnie wykorzystywanym środkiem bakteriobójczym służącym do dezynfekcji pomieszczeń i powierzchni pracowni biologicznych i medycznych.

Ze względu na szkodliwe oddziaływanie na organizm ludzki (w szczególności skórę

i oczy), podczas użytkowania lampy UV należy zachować szczególną ostrożność i stosować się do instrukcji postępowania BHP.

B.1.2. Odczynniki i roztwory

Poniżej opisane zostaną odczynniki i roztwory niezbędne do rutynowych działań związanych z hodowlą komórkową. Dla poszczególnych pozycji zamieszczamy krótki opis środka i jego dystrybutora w Polsce, jego zastosowanie do hodowli i sposób przechowywania oraz dodatkowe, szczególne informacje dotyczące na przykład czynności preparacyjnych koniecznych do wykonania przed pierwszym użyciem.

B.1.2.1 Pożywka DMEM

DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) jest zmodyfikowanym standardowym medium wzbogaconym dodatkowymi aminokwasami i witaminami. Standardowymi składnikami pożywki o określonym składzie chemicznym są zbuforowane płyny fizjologiczne złożone z soli nieorganicznych (zapewniają stałe ciśnienie osmotyczne i pH) oraz jony będące kofaktorami w reakcjach enzymatycznych.

Zastosowanie Pożywka (w polskiej literaturze zwana też często *podłożem*) dostarcza komórkom składników odżywczych niezbędnych do przeżywania, wzrostu i różnicowania: materiałów budulcowych, substratów dla metabolizmu, witamin, mikroelementów i jonów. Z definicji, pożywka (medium hodowlane) musi zapewnić przeżycie komórek przez przynajmniej 24 godziny [33].

Przechowywanie Butelkę przechowujemy w temperaturze 4°C w chłodziarce.

Dystrybutor Cytogen oferuje *DMEM 500 ml* (4,5g/l) *płynny z r-r pirogronianu sodu, z L-glutaminą* (nr katalogowy: CE5-843)

B.1.2.2 Surowica

Stanowi ją mieszanina różnorodnych makro i mikrocząsteczek w stężeniach fizjologicznych. Roztwór ten pobudza przeżywalność i wzrost hodowanych komórek dzięki zawartości czynników i hormonów stymulujących wzrost i funkcjonowanie komórek, czynników adhezyjnych poprawiających przyleganie komórek do substratu i między sobą. Mimo, że wyodrębniono i zidentyfikowano już większość składników wchodzących w skład surowicy, to wciąż jeszcze nie udało się opracować sztucznie syntezowanego uniwersalnego medium zapewniającego zadowalający poziom wzrostu i przeżywalność komórek w hodowli *in vitro*. Skład Do najważniejszych składników surowicy zaliczyć można:

- białka nośnikowe hormonów,
- czynniki wzrostu,
- albuminy,
- transferyny,
- czynniki adhezyjne,
- antyproteazy stanowią ją dwie grupy inhibitorów proteaz (enzymy hydrolizujące wiązania peptydowe), poza tym surowica może zawierać inhibitory proliferacji. Te ostatnie mogą powstać w procesie obróbki surowicy. Czynniki te potencjalnie mogą hamować hodowlę, np. poprzez reakcje krzyżowe między składnikami hodowli a przeciwciałami pochodzącymi z frakcji gammaglobulin. Stąd do znacznej części hodowli wykorzystuje się *inaktywowaną surowicę*.

Zastosowanie Surowica jest cennym uzupełnieniem pożywek o określonym składzie chemicznym – w zależności od typu hodowanych komórek dodaje się 5-20% surowicy.

Przechowywanie W procesie przygotowania przez producenta, tuż po przepuszczeniu przez filtry bakteryjne, surowica zostaje zamrożona do temperatury -20°C. W takim stanie może być przechowywana do 2 lat.

Inaktywacja W celu uniknięcia niepożądanego działania na hodowlę, w większości przypadków wykorzystujemy surowicę *inaktywowaną*. Proces ten przeprowadzamy umieszczając butelkę rozmrożonej wcześniej surowicy w łaźni wodnej o ustalonej temperaturze 56°C tak, by cała butelka była zanurzona. Po upływie 40-45 min surowicę usuwamy z łaźni i pozostawiamy do osiągnięcia temperatury pokojowej. Następnie odmierzamy żądaną ilość surowicy do bieżącego użycia (będzie przechowywana w chłodziarce), a pozostałą część ponownie zamrażamy.

Przygotowanie Surowicę należy szybko rozmrozić, np. w łaźni rotacyjnej w temperaturze 37°C. Po rozmrożeniu niezwłocznie usuwamy butelkę z łaźni w celu uniknięcia ogrzania. Po rozmrożeniu surowicę możemy przechowywać w chłodziarce w temperaturze 4°C przez okres 2-3 tygodni. **Dystrybucja** W hodowli najczęściej wykorzystuje się surowice płodowe z krwi płodów cieląt, bydląt i ludzi, rzadziej świńską, króliczą, jagnięcą, owczą, kozią czy kurczęcią. Cytogen oferuje *surowicę płodową cielęcą "GOLD"500 ml* (nr katalogowy: CA5-151)

B.1.2.3 Podłoże do zamrażania (I i II)

Zastosowanie Mieszanka podłoża I i II jest wykorzystywana przy mrożeniu komórek celem długotrwałego przechowywania i ochrony przed zakażeniem.

Przygotowanie

Podłoże I DMEM + 10% surowicy

Podłoże II DMEM + 20% surowicy + 20% DMSO

Przechowywanie Podłoże I i II przechowywać należy w chłodziarce w osobnych, szczelnie zamkniętych probówkach.

W zależności od pożądanego czasu przechowywania zamrożone komórki przechowywać można w temperaturze:

- -20°C do kilkunastu tygodni,
- -85°C przez kilka miesięcy,
- -196°C przez wiele lat.

B.1.2.4 Ciprofloksacyna

Zastosowanie Jest chemioterapeutykiem przeciwko zakażeniu mykoplazmami.

Przygotowanie 200 mg środka rozpuszczamy w 100 ml wody destylowanej. Kropla po kropli dodajemy stężony HCl każdorazowo mieszając, aż do całkowitego rozpuszczenia się proszku. Tak powstały roztwór przesączamy przez sączek filtracyjny 0.25

Stężenie używane w hodowli Dodajemy antybiotyku w stężeniu 50 μl na 10 ml

Przechowywanie Ciprofloxacina w proszku szczelnie zamkniętą w opakowaniu może pozostawać w temperaturze pokojowej. Przygotowany 0.2% roztwór przechowuje się w chłodziarce.

Dystrybutor Sigma-Aldrich oferuje *Ciprofloxacin* (nr katalogowy: 17850–5G–F)

B.1.2.5 DPBS

Zastosowanie Jest to zbalansowany roztwór soli fizjologicznej w modyfikacji Dulbecco wykorzystywany w hodowli komórkowej. Pełni rolę medium zapewniającego zewnątrz i wewnątrzkomórkwą równowagę osmotyczną i pH (7.2 - 7.6), dostarcza również wodę i jony niezbędne do normalnego metabolizmu.[36]

Przygotowanie 1 | roztworu

$$NaCl8.9 \ g$$

 $Na_2HPO_4 \times 12H_2O3 \ g$
 $NaH_2PO_4 \times H_2O255 \ mg$

B.1.2.6 Trypsyna z EDTA

Trypsyna należy do enzymów trawiennych. W hodowli wykorzystywana jest do odklejania komórek tworzących warstwę na dnie naczynia hodowlanego.

Skład 0.05% trypsyny + 0.02% EDTA w DPBS.

Przykład: przygotowanie 100 ml roztworu Mieszamy 100 ml DPBS + 20 mg EDTA + 50 mg trypsyny.

Przechowywanie Chłodziarka

Dystrybutor: gotowa mieszanka Cytogen oferuje gotową mieszankę *Trypsyna EDTA (1x)* (numer katalogowy: CL1-004).

B.1.2.7 GlutaMAX

Przygotowanie Do użytku w hodowli wykorzystujemy roztwór 5 ml GlutaMAX na 500 ml podłoża.

Przechowywanie Zamrożony do temperatury -20°C.

Dystrybutor ALAB oferuje *GlutaMAX 100 ml* (nr katalogowy: 3505–0038)

B.1.2.8 Błekit trypanu

Zastosowanie Barwnik stosowany podczas manualnego zliczania komórek w hemocytometrze. Poprzez wybarwienie ułatwia ich obserwację i pozwala na rozróżnienie komórek martwych i żywych. Ponieważ komórki martwe tracą zdolność do jego wydalania, obserwujemy w nich zagęszczenie barwnika.

Przygotowanie

- substrat w postaci proszku 50 mg proszku ubijamy i rozcieramy w moździerzu, rozpuszczamy w 100 ml DPBS, na koniec przesączamy przez bibułowy sączek. Podczas dozowania roztworu do badań wskazane jest pobieranie pipetą żądanej objętości z górnych warstw roztworu w celu uniknięcia pobrania osadu w postaci krystalizujących drobin, które znajdują się na dnie.
- substrat w postaci płynu błękit trypanu dostarczony w postaci płynnej może zostać rozcieńczony w DPBS do uzyskania stężenia 0.4%-0.5%, które w więk-szości przypadków wystarcza do wybarwienia komórek.

Przechowywanie Rozcieńczony w DPBS błękit trypanu przechowujemy w chłodziarce. Proszek lub stężony środek może być przechowywany w temperaturze pokojowej przez czas wskazany przez producenta.

Dystrybutor Błękit trypanu dystrybuowany jest przez Sigma-Aldrich w 20 ml butelkach (nr katalogowy: 8154–20ML)

B.2. Rutynowe czynności w hodowli komórek

Przebieg opisanych poniżej etapów hodowli i czynności związanych z badaniami angażującymi żywe komórkami opisany zostanie na podstawie hodowli fibroblastów ludzkich z linii *HS-5*. Nie mniej jednak metodyka pracy pozostaje niezmieniona dla większości hodowli komórkowych linii adherentnych – zmianie ulegają jednie stężenia używanych środków.

B.2.1. Rozmrażanie

Komórki, zwykle rozmnożone podczas kilkukrotnego przesiewania poprzedniej hodowli, mogą być przez dłuższy czas przechowywane w postaci zamrożonej. Poniżej opisujemy w punktach kroki konieczne do założenia hodowli z komórek znajdujących się w postaci zamrożonej.

- Przygotowujemy medium hodowlane W probówce przystosowanej do stosowania w posiadanej wirówce (np. Falcon 10 ml) umieszczamy kolejno 15% surowicy (1.5ml) i uzupełniamy podłożem. Surowica zawarta w roztworze zwiąże dimetylosulfotlenek – krioprotektant używany podczas zamrażania komórek (por. B.2.3 na stronie 86).
- 2. Dodajemy 1 cm³ rozmrożonych komórek
- 3. Wirowanie Wirujemy w wirówce (pamiętając o zrównoważeniu wirnika poprzez odpowiednie umocowanie przeciwwagi – identyczne probówki wypełnione wodą powinny znajdować się po przeciwnej stronie osi obrotu. Wirowanie powinno odbywać się przy 1200 obrotach na minutę w czasie 3-5 minut.
- 4. Przepłukiwanie peletki Po wirowaniu odciągamy nadsącz tak, by w probówce na dnie pozostała jedynie peletka (uważamy, by podczas odciągania nie została ona zaburzona). Do probówki przenosimy medium: 1 cm³ surowicy i 9 cm³ DMEM pilnując, by peletka uległa rozpuszczeniu. Ponownie wirujemy przy 1200 obr/min przez 3-5 minut.
- 5. Umieszczenie komórek w naczyniu hodowlanym Po wirowaniu i odciągnięciu nadsączu, przygotowujemy medium w naczyniu hodowlanym. Dla przykładu rozważmy butelkę do hodowli leżącej o pojemności 55 cm^3 . Umieszczamy w niej 25 cm^3 podłoża (DMEM z surowicą). Podczas wykorzystywania butelek hodowlanych o innej pojemności należy skontrolować przed wprowadzeniem medium czy wybrana objętość nie będzie powodowała zamoczenia korka po położeniu butelki w pozycji poziomej, w której przechowuje się naczynia w inkubatorze. Dodatkowo do roztworu dodajemy *ciprofoksacine* chemioterapeutyk zabezpieczający przed bakteryjną infekcją mykoplazmami. Cirpofoksaciny dodajemy w niewielkim stężeniu $50\mu m$ na 10 ml hodowli. Tak przygotowanym podłożem uważnie wypłukujemy peletkę, zawartość probówki przenosimy do naczynia hodowlanego. Następnie, pamiętając o odkręceniu korków w celu zapewnienia dostępu właściwego stężęnia CO_2 i temperatury, umieszczamy naczynie hodowlane w inkubatorze. Dla fibroblastów linii *HS-5*, temperatura inkubacji wynosi 37°C przy 5% stężeniu CO_2 .

B.2.2. Przesiewanie (pasażowanie)

Pasażowanie jest procesem pozwalający na rozrost hodowli w większej liczbie naczyń hodowlanych.

Co dobę kontrolujemy pod mikroskopem odwróconym pokrycie dna naczynia mnożącymi się i adherującymi komórkami. Po zaobserwowaniu zmiany koloru medium na żółtawy (zwykle po około 3 dobach hodowli w inkubatorze) i przy braku monowarstwowego pokrycia, należy wymienić medium hodowlane. Żółtawe zabarwienie jest skutkiem aktywności metabolicznej i świadczy o zużyciu składników odżywczych znajdujących się w roztworze. W procesie zmiany medium hodowlanego odciągamy zużytą pożywkę uważając, by nie naruszyć komórek wzrastających na dnie naczynia. Następnie naczynie uzupełniamy do zadanej objętości roztworem składającym się z DMEM, surowicy i ciprofloxaciny w zadanych proporcjach. Powyższy proces powtarzamy aż do uzyskania monowarstwowego pokrycia, tj. gdy dno naczynia hodowlanego będzie równomiernie pokryte przylegającymi do siebie komórkami. Wówczas możemy przystąpić do *przesiewania (pasażowania) hodowli.* Zbyt długie przetrzymanie hodowli skutkuje odklejaniem się agregatów komórek od dna, co prowadzi do ich apoptozy. Proces ten ma na celu rozdzielenie namnożonych komórek pomiędzy kolejne naczynia hodowlane i składa się z kilku etapów:

1. Odklejanie komórek

- Rozpoczynamy od odciągnięcia medium hodowlanego z naczynia. Pozostaną w nim wówczas jedynie komórki związane do dna naczynia.
- Trypsynowanie Następnie do naczynia wprowadzamy $3 4 \ cm^3$ trypsyny z EDTA. Rozprowadzamy ją po powierzchni dna unikając kontaktu z korkiem.
- Naczynie wstawiamy do inkubatora na 3-4 minuty.
- Po wyciągnięciu z inkubatora, trzymając płasko naczynie w jednej ręce, strzepujemy intensywnie uderzając nim kilkukrotnie o wnętrze drugiej dłoni w celu oderwania jeszcze związanych komórek. Proces powtarzamy zmieniając ręce. Po zakończeniu, odwracając naczynie powinniśmy zaobserwować spływające komórki tworzące mętny osad.
- W razie wątpliwości związanych z odklejeniem komórek, kontrolujemy powierzchnię naczynia pod mikroskopem odwróconym. Jeśli obserwowane komórki będą płaskie, wrzecionowate – wciąż są związane; komórki odczepione, unoszące się swobodnie w roztworze przyjmują kształt okrągły.
- 2. Przepłukiwanie ma na celu pozbycie się trypsyny użytej w celu odklejenia komórek od naczynia; zwykle już dwukrotne przepłukanie z odwirowaniem w roztworze DMEM i surowicy wystarcza. Obecność surowicy jest niezbędna – wiąże ona enzym trawienny (trypsynę), którą chcemy wyeliminować z podłoża do późniejszej hodowli. W razie zaobserwowania niepożądanych zjawisk podczas hodowli, zaleca się zwiększyć liczbę płukań.
 - Komórki zawieszone w trypsynie przenosimy pipetą z naczynia hodowlanego do probówki.
 - Uzupełniamy do 10 ml podłożem zwierającym 20% surowicy.

- Wirujemy 3-5 minut przy 1200 obr/min.
- Odciągamy supernatant⁴ pozostawiając nienaruszoną peletkę.
- Uzupełniamy do 10 ml podłożem zwierającym 20% surowicy.
- Wirujemy 3-5 minut przy 1200 obr/min.
- Odciągamy supernatant pozostawiając nienaruszoną peletkę.

3. Rozdzielnie do nowych naczyń hodowlanych

- Peletkę powstałą po opłukiwaniu rozpuszczamy w 3 cm^3 podłoża.
- Gdy przed odklejeniem całe dno było równomiernie porośnięte, powstały roztwór zawierający komórki rozdzielamy pomiędzy 3 naczynia hodowlane. W razie jedynie częściowego porośnięcia lub pożądanego wyższego początkowego stężenia komórek, rozdzielamy jedynie na 2 naczynia.
- Po rozdzieleniu komórek, zawartość naczyń uzupełniamy podłożem DMEM zawierającym 15% surowicy (w przypadku fibroblastów) dla naczynia 55 cm^3 uzupełniamy do 15 20 cm^3 , po czym dodajemy ciprofloxacynę (chemioterapeutyk przeciwko mykoplazmom).
- Naczynia hodowlane umieszczamy w inkubatorze (37°C przy 5% stężeniu CO_2 dla fibroblastów) pamiętając o rozszczelnieniu korka w celu zapewnienia dostępu powietrza.

Linie komórkowe ze względu na możliwą liczbę pasaży dzieli się na półciągłe i ciągłe. Linie półciągłe (*finite line cells*) składają się z prawidłowych, diploidalych komórek wykazujących naturalny poziom zróżnicowania. Wiąże się to z ich limitowanym czasem życia zdeterminowanym przez dostępną (przed zaprogramowaną śmiercią komórki) liczbę podziałów komórkowych. W zależności od typu komórek, linia półciągła zamiera zwykle po 20–80 pasażach. Ciągłe linie komórkowe są pozbawione tego ograniczenia. Izoluje się je z tkanek zmienionych nowotworowo bądź też transformuje przez indukcję w hodowli in vitro. W praktyce okazuje się, że nie wszystkie typy komórek poddają się takiej transformacji. Przykładem są wykorzystywane przez nas w badaniach linie fibroblastów ludzkich, które praktycznie nigdy nie transformują się w linię ciągłą. Stąd podczas badań dbać należy o to, by komórki użyte do serii badań pochodziły z tego samego pasażu.

B.2.3. Zamrażanie

Zamrożenie komórek pozwala zatrzymać procesy metaboliczne i przechowywać komórki przez okres od kilku tygodni do nawet kilku lat (w zależności od temperatury

 $^{{}^{4}}$ **Supernatant** jest górną, płynną warstwą wyodrębniającą się podczas wirowania lub strącania.

przechowywania). Krioprezerwacja w zależności od temperatury, pozwala na spowolnienie procesów komórkowych (poniżej -20°), zatrzymanie procesów biochemicznych (poniżej -130°) oraz zatrzymanie wszelkich procesów metabolicznych (poniżej -196°). Możliwość zamrażania i przechowywania komórek tworząc tzw. *banki komórek* niesie ze sobą szereg korzyści:

- redukuje zagrożenie kontaminacją obcymi mikroorganizmami,
- w wyniku zatrzymania procesów podziałów komórkowych, ogranicza mutacyjną modyfikację kolejnych generacji komórek (zmiany fenotypowe),
- zmniejsza koszty i czas związany z utrzymaniem ciągłej hodowli.

W procesie zamrażania komórek, stosuje się *krioprotektanty*. Są to substancje ochronne mające ułatwić dehydratację komórki podczas jej powolnego zamarzania i równocześnie zabezpieczyć przed niekorzystnymi zjawiskami towarzyszącymi odwodnieniu: tworzeniu się ostrych krystalitów wody, wytrącaniu się złogów zagęszczonego cytozolu, ucieczce jonów, wysalaniu białek czy destabilizacji pH [38]. W roli krioprotektantów najczęściej wykorzystuje się glicerol i dimetylosulfotlenek (DMSO). Glicerol jest mniej toksyczny od DMSO, jednakże ten drugi charakteryzuje się większą szybkością przenikania przez błonę do wnętrza komórki, przez co zapewnia lepszą ochronę. Proces zamrażania jest realizowany w kilku krokach:

- 1. I i II podłoże do zamrażania tuż przed rozpoczęciem procesu umieszczamy w chłodziarce niedopuszczając do zamarźnięcia. Procedura jest zalecana, ponieważ podczas łączenia I i II podłoża zachodzi egzoenergetyczna reakcja powodująca podniesienie temperatury roztworu, co potencjalnie może zagrozić komórkom.
- 2. Podobnie jak w przypadku pasażowania, komórki hodowane w naczyniu trypsynujemy, a następnie płuczemy.
- 3. Powstałą peletkę rozdzielamy pomiędzy probówki do zamrażania rozpuszczając ją w I i II podłożu w proporcjach 1:1. Liczba fiolek zależy od żądanego stężenia komórek. Zaleca się, by stężenie mrożonych komórek zawierało się w przedziale $10 - 20 \cdot 10^6$ komórek/ml. Stąd w przypadku równomiernie porośniętego dna, powstałą peletkę należy rozdzielić pomiędzy 2-3 fiolki. Zwykle mają one pojemność 1 cm^3 . Wówczas, gdy chcemy przygotować do zamrożenia dwie fiolki, do probówki zawierającej peletkę dodajemy 1 cm^3 I podłoża rozpuszczając peletkę, a następnie 1 cm^3 II podłoża. Po tym, zawiesinę zawierającą komórki przenosimy do probówek przystosowanych do zamrażania.

B.2.4. Hodowla na płytkach

Do badań angażujących hodowle komórkowe często stosuje się płytki z określoną liczbą dołków (standardowo: 6, 12, 16, 24, 48). Zaletą ich wykorzystania są zbliżone dla wszystkich dołków warunki wzrostu i środowiska dla hodowanych komórek. Warunki takie pozwalają wzrastać komórkom przez wiele tygodni. Warunkiem jest jednak zapewnienie ciągłości dostępu do składników odżywczych, co uzyskujemy poprzez wymianę medium hodowlanego po zaobserwowaniu zmiany jego zabarwienia (średnio co kilka dni).

Początkowa zawartość komórek Początkowa liczba komórek w każdym z dołków zależy od planowanego czasu eksperymentu. Przy *hodowli długiej* (2-3 tygodnie) początkowa liczba komórek powinna wynosić ok. $2 \cdot 10^4$ komórek/ml, natomiast w przypadku hodowli krótkiej (*3-5 dni*) początkowe stężenie powinno być większe – $1 \cdot 10^5$ komórek/ml.