

WPŁYW MODYFIKACJI POWIERZCHNI TiN METODĄ LITOGRAFII NA AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNĄ KOMÓREK

A.ZAJĄCZKOWSKA^{1*}, M.BRUDEK¹, J.BIERŁA², T.BOROWSKI³,
R.LAPPALAINEN⁴, T.WIERZCHOŃ^{3*}, E.CZARNOWSKA¹

¹ZAKŁAD PATOLOGII,
INSTYTUT "POMNIK - CENTRUM ZDROWIA DZIECKA",
AL. DZIECI POLSKICH 20, 04-730 WARSZAWA, POLSKA

²WYDZIAŁ MEDYCYNY WETERYNARYJNEJ,
SZKOŁA GŁÓWNA GOSPODARSTWA WIEJSKIEGO,
UL. NOWOURSYNOWSKA 166, 02-787 WARSZAWA, POLSKA

³WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ, POLITECHNIKA WARSZAWSKA,
WOŁOSKA 141, 02-507 WARSZAWA, POLSKA

⁴DEPARTMENT OF PHYSICS, UNIVERSITY OF KUOPIO, FINLAND

*MAILTO: CZAR@CZD.WAW.PL

[Inżynieria Biomateriałów, 89-91, (2009), 52-54]

Wstęp

Biomateriał z warstwą wytworzoną na stopie tytanu Ti6Al4V zawierającą TiN w strefie zewnętrznej charakteryzuje się dużą biogodnością z osteoblastami [1]. Powszechnie wiadomo, że rozwinięcie powierzchni biomateriału metodą litografii zmienia aktywność biologiczną komórek [2]. Dlatego dla poprawy połączenia implantu z kością oraz biogodności z błoną śluzową powierzchnia TiN została poddana rytowaniu. Stąd celem pracy było zbadanie bioaktywności osteoblastów i fibroblastów, komórek warunkujących prawidłową integrację wszczepu tytanowego z kością.

Materiały i metody

Warstwy typu TiN+Ti₂N+αTi(N) wytworzono na stopie tytanu Ti6Al4V w procesie azotowania w warunkach wyładowania jarzeniowego, a następnie były poddane rytowaniu. Próbkę niemodyfikowaną były materiałem referencyjnym.

Ludzka linia osteoblastyczna Saos-2 i fibroblasty pobrane z ludzkiej skóry były hodowane na badanych biomateriałach przez 24 godziny oraz 2, 6 i 12 dni. Biogodność materiałów badano za pomocą: skaningowego mikroskopu elektronowego (analiza morfologii i rozmieszczenia komórek), mikroskopu konfokalnego (uwalnianie fibronektyny i ekspresja receptora dla fibronektyny CD 49e), technik ELISA (badanie poziomu cytokin IL-1, IL-6) oraz testu MTT (proliferaacja komórek) i testu ALP (aktywność komórek). Wymieniowe techniki badawcze zostały opisane w publikacji [2].

Wyniki

Metodą litografii wytworzono na powierzchni warstwy typu TiN+Ti₂N+αTi(N) zagłębienia o średnicy 123μm. Badania struktury warstwy wykazały jej dyfuzyjny charakter oraz nanokrystaliczną strukturę zewnętrznej strefy TiN.

Komórki osteoblastyczne linii Saos-2 hodowane na modyfikowanej powierzchni TiN były silnie rozplaszczone i zaokrąglone na obwodzie oraz nie tworzyły wypustek. Komórki te w pierwszej dobie inkubacji nie adherowały w wytworzonych zagłębieniach a jedynie na powierzchni warstwy pomiędzy nimi (RYS.1A). Z adherowane komórki charakteryzowała wysoka ekspresja receptorów CD49e oraz synteza fibronektyny (RYS.2A,B). Wykazywały także wyższy potencjał proliferacyjny niż komórki adherowane

THE EFFECTS OF TiN MODIFICATION BY LITHOGRAPHY ON CELLS BEHAVIOR

A.ZAJĄCZKOWSKA^{1*}, M.BRUDEK¹, J.BIERŁA², T.BOROWSKI³,
R.LAPPALAINEN⁴, T.WIERZCHOŃ^{3*}, E.CZARNOWSKA¹

¹PATHOLOGY DEPARTMENT,
THE CHILDREN'S MEMORIAL HEALTH INSTITUTE,
20 DZIECI POLSKICH AVE., 04-730 WARSAW, POLAND

²FACULTY OF VETERINARY MEDICINE,
WARSAW AGRICULTURAL UNIVERSITY,
166 NOWOURSYNOWSKA STR., 02-787 WARSAW, POLAND

³FACULTY OF MATERIALS SCIENCES AND ENGINEERING,
WARSAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,
141 WOŁOSKA STR., 02-507 WARSAW, POLAND

⁴DEPARTMENT OF PHYSICS, UNIVERSITY OF KUOPIO, FINLAND

*MAILTO: CZAR@CZD.WAW.PL

[Engineering of Biomaterials, 89-91, (2009), 52-54]

Introduction

It's generally accepted that lithography modified surface influences on biological cell activity and spreading [1]. The facts of high biocompatibility of the TiN, present in the external zone of surface layer produced on Ti6Al4V alloy, with osteoblasts give input for its further modifying by lithography to promote bone-bonding behavior [2].

The aim of this study was testing significance of TiN surface modification by lithography for cell bioactivity related to osteoconductivity.

Materials and methods

The surface layers TiN+Ti₂N+αTi(N) type were produced by glow discharge nitriding process on titanium alloy Ti6Al4V and then engraved by lithography. Samples without engraving were reference material.

Human osteoblast-like cells Saos-2 line and skin fibroblasts were cultured on tested samples by 24 hours and 2, 6 and 12 days. The biocompatibility of the tested materials was verified by using scanning electron microscope (analysis of cell morphology and distribution), confocal microscope (release of fibronectin and CD49e expression), ELISA technique (cytokines IL-1, IL-6), and applying MTT test (cell proliferation) and ALP test (cell activity) presented in details in previous papers [2].

Results

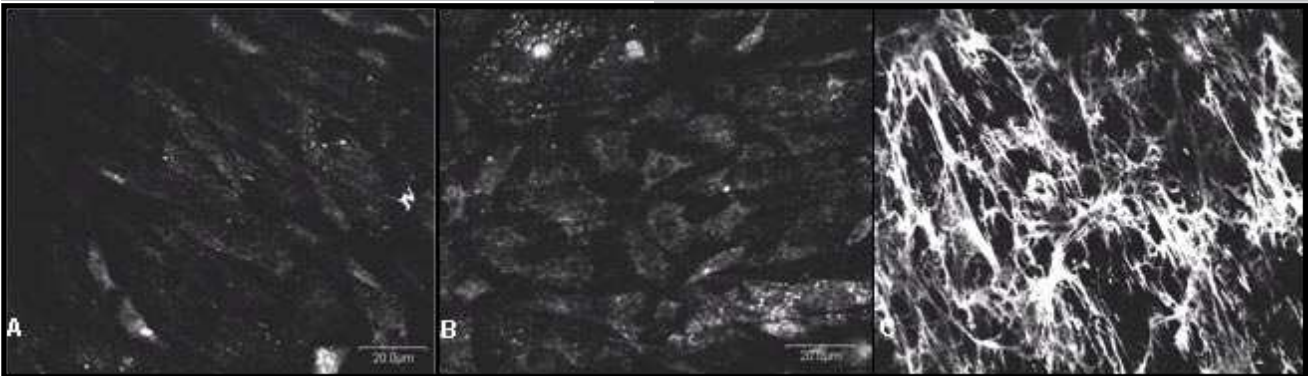
Regularly distributed hollows of diameter 123 μm were present on TiN+Ti₂N+αTi(N) layers. Investigation showed diffusion character of this surface layer and nanocrystalline structure of the TiN outer zone.

Osteoblast cells Saos-2 cultured on the engraving TiN were flattened or round shape and distributed mainly between hollows (FIG.1A). They were characterized by: disperse expression of fibronectin (FIG.2A,B) and condensed CD49e receptors (not shown) and exhibited higher proliferation when compared with osteoblasts adhered to the reference material (FIG.3A).



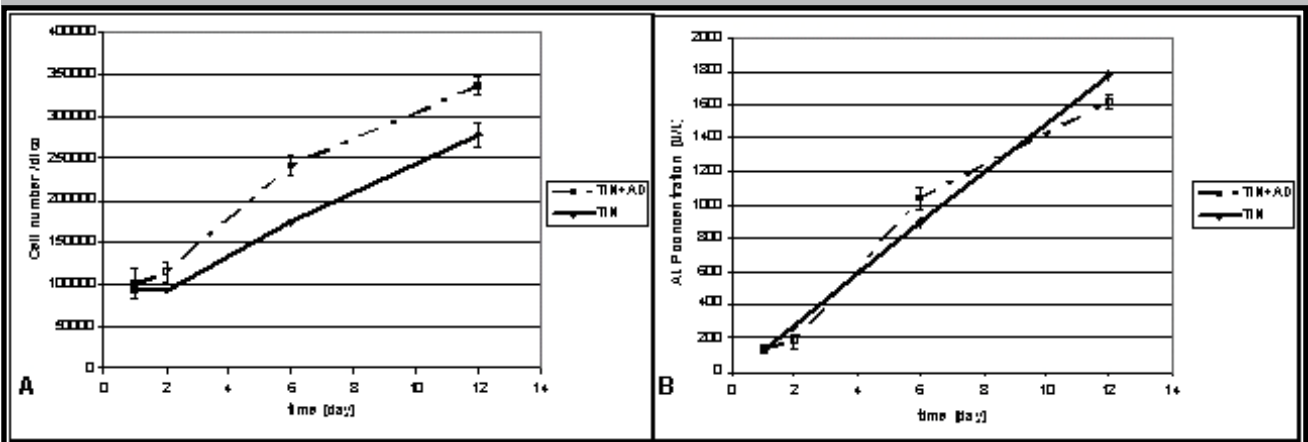
RYS.1. Rozmieszczenie i morfologia osteoblastów linii Saos-2 (A, B) i fibroblastów (C, D) na warstwach typu TiN+Ti₂N+αTi(N) po (A, C) i przed (B, D) litografią.

FIG.1. Distribution and morphology osteoblast Saos-2 line (A, B) and fibroblasts (C, D) on the surface layers TiN+Ti₂N+αTi(N) type after (A, C) and before (B, D) engraved by lithography.



RYS.2. Rozmieszczenie fibronektyny produkowanej przez osteoblasty linii Saos-2 (A, B) i fibroblasty (C) na warstwie TiN+Ti₂N+αTi(N) po (A) i przed (B, C) litografią.

FIG.2. Distribution of fibronectin produced by osteoblast cell Saos-2 line (A, B) and fibroblasts (C) on the surface layers TiN+Ti₂N+αTi(N) type after (A) and before (B, C) engraved by lithography.



RYS.3. Biologiczna aktywność osteoblastów linii Saos-2 hodowanych na warstwie typu TiN+Ti₂N+αTi(N) przed i po litografii. A – proliferacja komórek, B – stężenie ALP w mediach hodowlanych.

FIG.3. Biological activity of osteoblast Saos-2 line cultured on the surface layers TiN+Ti₂N+αTi(N) type after and before engraved by lithography A – cell proliferation, B – concentration ALP in culture medium.

na materiale referencyjnym (RYS.3A).

Osteoblasty hodowane na referencyjnych próbkach były różnokształtne lub okrągłe i tworzyły bardzo cienkie wypustki (RYS.1B). Receptory dla fibronektyny (CD 49e) zlokalizowane błonie komarkowej były rozproszone. Stężenie fosfatazy zasadowej (ALP), enzymu związanego z procesami kościotworzenia, w mediach inkubacyjnych zebranych z nad hodowli prowadzonych na obydwóch materiałach były podobne (RYS.3 B) podczas gdy poziom cytokin IL-1 i IL-6 był poniżej czułości testu.

Fibroblasty hodowane na badanych biomateriałach były równomiernie rozmieszczone na całej powierzchni zarówno próbek poddanych litografii jak i kontrolnych. Na powierzchni próbek modyfikowanych komórki adherowały również w wytworzonych zagłębieniach (RYS.1C,D). Komórki miały

Osteoblasts on reference samples were polymorphic or spherical with needle-like protrusion (FIG.1B) and had dispersed adhesion receptors. The ALP concentration in media retrieved osteoblasts cultured on both type of samples was similar (FIG.3B), while cytokines IL-1 and IL-6 were not found in any time point.

Investigations of fibroblasts showed their regular distribution without restraint to area between hollows (Fig.1C,D). Adhered cells were spindle or polymorphic shape and exhibited increased expression of CD49e receptor. They produced fibronectin biofilm forming a fibrillar network (Fig. 2C). There were no found differences in cell behavior in populations incubated on both engraved and reference material.

Conclusions. Data suggest that osteoblast adherent to

różny kształt i wykazywały silną ekspresję receptora dla fibronektyny (CD49e) oraz intensywnie syntezowały i wydelały fibronektynę. Wydzielana fibronektyna tworzyła na powierzchni biomateriałów włóknowy biofilm (RYS.2C). Nie obserwowano różnic w proliferacji fibroblastów inkubowanych na rytowanych i referencyjnych biomateriałach.

Wnioski

Badania wykazały, że rytowana powierzchnia biomateriału tytanowego modyfikuje aktywność biologiczną osteoblastów ale nie fibroblastów. Wytworzone zagłębienia chociaż ograniczają dostępną dla osteoblastów powierzchnię to jednak aktywują ich proliferację. Może to być efektem przebudowy receptorów błonowych. Specyficzne zachowanie komórek na powierzchniach modyfikowanych litograficznie jest znanym faktem opisanym w literaturze [3]. Uważa się, że przyczyną jest zmieniona interakcja komórek z powierzchnią materiału. Obserwowana przez nas zmniejszone powinowactwo osteoblastów w porównaniu z fibroblastami do rytowanych powierzchni jest zgodne z danymi literaturowymi [4] i może być wykorzystane w przyszłości dla obróbki powierzchni implantów kontaktujących się z kością i błoną śluzową.

Podziękowania

Badania były finansowane z projektu: PB-117/ERA/2006/02/01.

BADANIA POWIERZCHNI PANEWKI STAWU BIODROWEGO PO DZIESIĘCIU LATACH KONTAKTU Z ORGANIZMEM

M.CIEŚLIK¹, K.MLEKODAJ¹, A.M.JANUS², T.ŁOJEWSKI¹, K.ENGVAL³, A.KOTARBA¹

¹WYDZIAŁ CHEMII, UNIwersYTET Jagielloński, Ingardena 3, 30-060 Kraków, Polska, cieslik@chemia.uj.edu.pl

²Instytut Metalurgii i Inżynierii Materiałowej, PAN, W. Reymonta 25, 30-059 Kraków, Polska

³Swerea KIMAB AB. P. .O., Box 55970, SE-10216 Sztokholm, Szwecja

[Inżynieria Biomateriałów, 89-91, (2009), 54-56]

Wstęp

Z roku na rok wzrasta zapotrzebowanie na operacje wszczepiania implantów stawu biodrowego zarówno dla pacjentów w każdym przedziale wiekowym jak i na każdym poziomie życia. Wzrasta również zapotrzebowanie na operacje wymiany endoprotez. Przeciętna długość życia stosowanych implantów stawu biodrowego waha się w przedziale 10–15 lat. Jednak przy obecnym wzroście poziomu życia ludzi czas ten jest za krótki, w szczególności gdy wymagana jest re-operacja, która wiąże się często z komplikacjami. Najczęstszą przyczyną wszczepienia implantu jest choroba zwyrodnieniowa. Większość

engraving surface may possess altered motility compared with cell on control surface and fibroblasts. This might be results of receptor remodeling. Specific cellular behavior on lithography modified surfaces is known fact [3]. The reason are changes of initial cells interaction with surface. Our finding of diminished affinity of osteoblasts when compared to fibroblast to engraving surface is in agreement with literature data [4] and could be valuable in future engineering of implant-bone-mucosa interface.

Acknowledgements

This study was financed by project: PB-117/ERA/2006/02/01.

Piśmiennictwo

References

- [1]. Czarnowska E., Sowińska A., Cukrowska B., Wierzchoń T. Response of human osteoblast like cells and fibroblast to titanium alloy nitrided under glow discharge. Mat. Sci. Forum. (2005) 475-479: 2415-18
- [2]. Czarnowska E., Zajączkowska A. et al. Composite layer with Ti3P external zone produced on titanium alloy for bone applications, Adv. Science Technol. 49 (2006) 240
- [3]. Hart A., Gadegaard N., Wilkinson CDW., et al. Osteoprogenitor response to low-adhesion nanotopographies originally fabricated by electron beam lithography. J mater Sci Mater Med 18 (2007)1211-18
- [4]. Webster TJ., Ergun C., Doremus RH., et al. Specific proteins mediate enhanced osteoblast adhesion on nanophase ceramics. J Biomed Mater Res. 52 (2000) 475-83

INVESTIGATIONS OF A HIP JOINT SURFACE AFTER 10 YEARS OF USE IN VIVO

M.CIEŚLIK¹, K.MLEKODAJ¹, A.M.JANUS², T.ŁOJEWSKI¹, K.ENGVAL³, A.KOTARBA¹

* Faculty of Chemistry, Jagiellonian University, Ingardena 3, 30-060 Krakow, Poland, cieslik@chemia.uj.edu.pl

** Institute of Metallurgy and Materials Science, PAS, W. Reymonta 25, 30-059 Krakow, Poland

*** Swerea KIMAB AB. P. .O., Box 55970, Se-10216 Stockholm, Sweden.

[Engineering of Biomaterials, 89-91, (2009), 54-56]

Introduction

Hip replacement therapy is increasingly common for patients of all ages and lifestyles, and with it the number of hip implants which must themselves be replaced due to failure. Current hip implants have lifetimes of the order of 10-15 years, but as human life (and quality of life) expectancy increases this is becoming inadequate, particularly as a second replacement operation is frequently much more difficult, and normally has a worse prognosis. The most frequent cause of surgical intervention is hip osteoarthritis [1,2]. Hip arthroplasty is an orthopedic procedure that involves the surgical excision of the head and proximal medullar