

ODPOWIEDŹ BIOLOGICZNA OSTEOBLASTÓW LINII SAOS-2 INKUBOWANYCH NA WARSTWIE Ti₃P+(Ti-Ni) IMPLANTOWANEJ JONAMI WAPNIA

A. ZAJĄCZKOWSKA^{1*}, T. BOROWSKI², B. RAJCHEL³,
T. WIERZCHOŃ², E. CZARNOWSKA¹

¹ INSTYTUT – POMNIK CENTRUM ZDROWIA DZIECKA,
ZAKŁAD PATOLOGII, WARSZAWA,

² POLITECHNIKA WARSZAWSKA,

WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ, WARSZAWA

³ POLSKA AKADEMIA NAUK, INSTYTUT FIZYKI JĄDROWEJ, KRAKÓW

* E-MAIL: E.CZARNOWSKA@CZD.PL

[Inżynieria Biomateriałów, 77-80, (2008), 99-101]

Wstęp

Biomateriały tytanowe dotychczas stosowane na implanty kostne nie spełniają wymogów stawianych materiałom użytkowanym długookresowo. Powszechnie wiadomo, że wprowadzanie jonów Ca i/lub P w warstwę wierzchnią biomateriałów tytanowych zwiększa bioaktywność i osteointegrację implantu, podczas gdy poprzez wytworzenie warstwy powierzchniowej można poprawić ich właściwości mechaniczne [1,2]. Nasze wcześniejsze badania dotyczące wytworzenia warstwy typu Ti₃P+(Ti-Ni) metodą duplexową wykazały, że warstwa poprawia właściwości mechaniczne, jest bioaktywna w SBF i biozgodna z osteoblastami linii Saos-2 [3,4]. Stąd celem pracy było zbadanie, w jakim stopniu implantacja jonów wapnia do warstwy typu Ti₃P+(Ti-Ni) wpływa na biozgodność biomateriału tytanowego.

Materiały i metody

Warstwy dyfuzyjne typu Ti₃P+(Ti-Ni) wytworzono na stopie tytanu Ti6Al4V metodą hybrydową przez połączenie procesów chemicznego osadzania warstwy nikloowo-fosforowej i obróbki jarzeniowej. Wapń wprowadzono w warstwę fosforów metodą implantacji jonów.

Biozgodność warstw Ti₃P+(Ti-Ni) przed i po implantacji jonów wapnia oraz materiału w stanie wyjściowym (stop Ti6Al4V) badano z osteoblastami linii Saos-2 (ATCC) w 8, 24 i 48 godzinnych oraz 6 i 12 dniowych hodowlach. Analizowano morfologię i rozmieszczenie komórek (SEM), proliferację komórek (test MTT) oraz uwalnianie alkalicznej fosfatazy (ALP, spectrophotometric method), natomiast w medium inkubacyjnym zebrany z nad hodowli badano obecność składników stopów tytanu (EDS).

Wyniki

Implantowane jony wapnia były regularnie rozmieszczone na powierzchni warstwy i nie wpływały na rozmieszczenie komórek (RYS. 1). Badania biozgodności wykazały tworzenie na całej powierzchni badanych biomateriałów niewielkich skupisk komórek (RYS. 2A,B).

BIOLOGICAL RESPONSE OF OSTEOBLAST SAOS-2 LINE TO CALCIUM IONS IMPLANTED SURFACE LAYER Ti₃P+(Ti-Ni) TYPE

A. ZAJĄCZKOWSKA^{1*}, T. BOROWSKI², B. RAJCHEL³,
T. WIERZCHOŃ², E. CZARNOWSKA¹

¹ THE CHILDREN'S MEMORIAL HEALTH INSTITUTE,
PATHOLOGY DEPARTMENT, WARSAW, POLAND

² WARSAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, FACULTY OF MATERIALS
SCIENCES AND ENGINEERING, WARSAW, POLAND

³ PAS, INSTITUTE OF NUCLEAR PHYSICS, CRACOW, POLAND

* E-MAIL: E.CZARNOWSKA@CZD.PL

[Engineering of Biomaterials, 77-80, (2008), 99-101]

Introduction

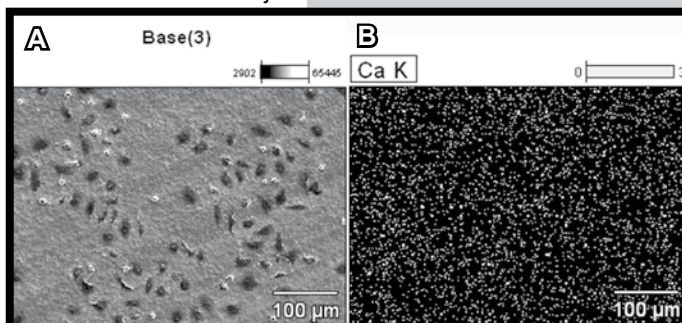
Currently applied titanium biomaterials for bone implants do not fulfil demands in a long term use. It is widely accepted that implantation of Ca and/or P ions into the biomaterial surface improves its bioactivity and biocompatibility while by producing surface layer on titanium alloy might be increased mechanical properties of the bulk material [1,2]. Our previous study revealed that surface layer Ti₃P+(Ti-Ni) type produced on titanium alloy Ti6Al4V by duplex method improves mechanical properties, bioactivity and biocompatibility of the reference material [3,4]. Thus the aim of the present study was to exam how modification of the surface by producing surface layer with titanium phosphide followed by implantation of Ca ions affects titanium alloy bioactivity and biocompatibility.

Materiały i metody

The composite surface layers Ti₃P+(Ti-Ni) type were produced by a duplex method on titanium alloy Ti6Al4V type and then followed by Ca ion implantation. The samples of titanium alloy without surface layers were used as the reference material. The biocompatibility tests were performed in a culture of osteoblast-like cells Saos-2 line in direct contact with biomaterials. Cells were incubated on samples by 8, 24, 48 hours and 6, and 12 days. There were analyzed cell morphology and distribution (SEM) and proliferation (MTT test) and release of alkaline phosphatase (ALP). In incubation mediums collected from the cell cultures an elements released from titanium alloy were measured (EDS).

Results

Calcium ions implanted were regular distributed on the surface and did not influence on cell arrangement (FIG. 1). The biocompatibility experiments showed small aggregates of osteoblasts spread on whole surface of the tested samples (FIG. 2A,B).

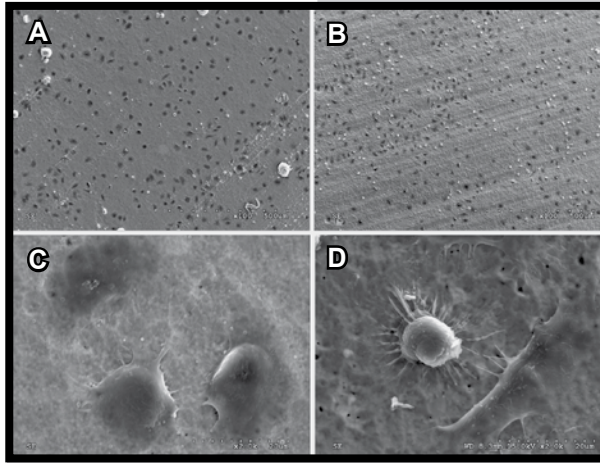


RYS. 1. Rozmieszczenie osteoblastów linii Sao-2 (A) i jonów Ca na powierzchni próbki (B).
FIG. 1. Distribution of osteoblasts Saos-2 line (A) and Ca ions on surface layer (B).

Pojedyncze osteoblasty w rosnących populacjach były sferyczne. Najwięcej komórek sferycznych było na próbkach z implantowanymi jonami wapnia (RYS. 2C,D).

Pomiary potencjału proliferacyjnego komórek i stężenia fosfatazy zasadowej wydzielonej przez osteoblasty rosnące na stopie Ti6Al4V oraz na warstwie typu $Ti_3P+(Ti-Ni)$ przed i po implantacji jonów wapnia wykazały porównywalny i systematyczny wzrost obu parametrów (RYS. 3). W 12 dobie inkubacji więcej komórek i większe stężenie ALP obserwowano w hodowłach prowadzonych na próbkach z warstwą Ti_3P implantowaną jonami Ca niż na próbkach z referencyjną warstwą.

Badania próbek wykonanych ze stopu tytanu Ti6Al4V z warstwą Ti_3P przed i po implantacji jonów wapnia wykazały, że wytworzone warstwy chronią przed uwalnianiem składników stopu do środowiska biologicznego.



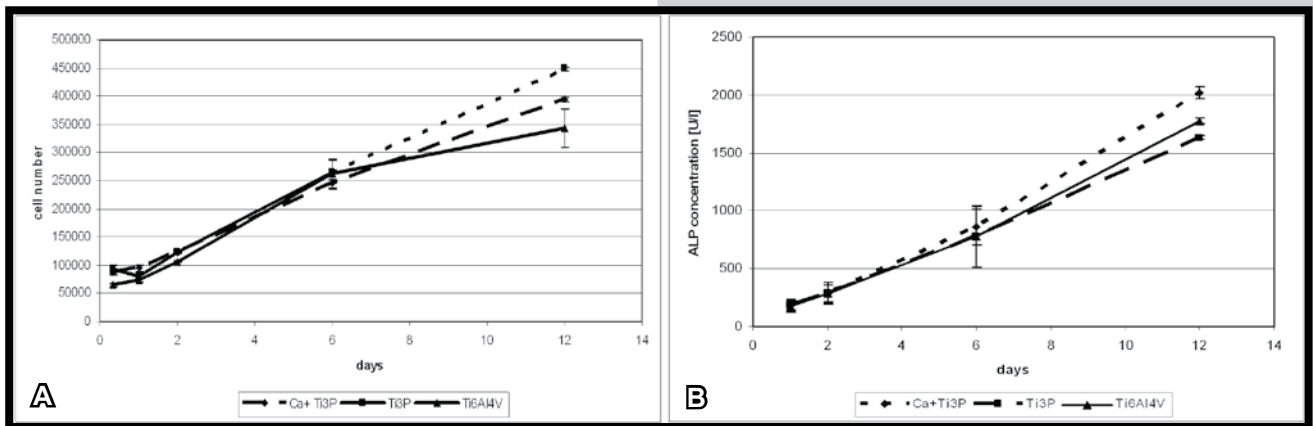
RYS. 2. Rozmieszczenie (A, B) i morfologia (C, D) osteoblastów linii Saos-2 osiedlonych na referencyjnej warstwie Ti_3P (A, C) i po implantowaniu jonów wapnia (B, D). FIG. 2. Distribution (A, B) and morphology (C, D) osteoblast Saos-2 line cultured on reference Ti_3P surface (A, C) and Ca ions implanted (B, D).

The single osteoblasts in the population were spherical. Spherical cells were the most numerous on surface layers implanted Ca ions (FIG. 2C,D).

Measurements of cell proliferation and ALP concentration in the media obtained from a osteoblast cultures conducted on titanium alloy Ti6Al4V and on surface layer $Ti_3P+(Ti-Ni)$ type before and after implantation of Ca ions showed similar and systematic increase both parameters (FIG. 3). On 12 day of culture the most numerous cells and the highest concentration of ALP were observed when osteoblasts have been incubated on samples with surface layers implanted Ca ions.

Microanalysis of elements in culture medium collected from experiments with samples of titanium alloy Ti6Al4V with reference surface layer $Ti_3P+(Ti-Ni)$ and after implantation Ca ions

showed that the layers protect against release of titanium alloy elements into biological environment.



RYS. 3. Aktywność biologiczna osteoblastów linii Saos-2 hodowanych na warstwach typu $Ti_3P+(Ti-Ni)$ przed i po implantacji jonów wapnia oraz stopie tytanu Ti6Al4V. A - proliferacja komórek, B – stężenie uwolnionej z komórek fosfatazy zasadowej.

FIG. 3. Biological activity of osteoblasts Saos-2 line cultured on titanium alloy Ti6Al4V and reference surface layer $Ti_3P+(Ti-Ni)$ type and implanted Ca ions. A – cell proliferation, B – concentration ALP in culture medium.

Podsumowanie

Nasze badania wskazują, że obecność jonów wapnia w warstwie $Ti_3P+(Ti-Ni)$ nie wpływa na adhezję i rozmieszczenie komórek, ale zwiększa proliferację osteoblastów w porównaniu z materiałem referencyjnym - stopem tytanu z warstwą typu $Ti_3P+(Ti-Ni)$. Ponadto implantacja jonów aktywuje komórki do syntezy fosfatazy zasadowej, enzymu związanego z kościotworzeniem.

Wcześniejsze badania warstwy typu $Ti_3P+(Ti-Ni)$ na stopie Ti6Al4V, wykazały, że obecność warstwy znacząco poprawia mikrotwardość i odporność korozyjną stopu tytanu [3-5]. Ponadto, badania biologiczne wykazały wyższy potencjał proliferacyjny osteoblastów linii Saos-2 na tym materiale w porównaniu z materiałem wyjściowym (Ti6Al4V) oraz ich większą aktywność biologiczną wyrażającą się wyższym stężeniem ALP i transformującego czynnika wzrostu w mediach hodowlanych.

Summary

Our studies show that the presence of calcium ions in surface layer Ti_3P do not influence cell adhesion and distribution but increase osteoblasts proliferation when compared with reference material – titanium alloy with surface layer $Ti_3P+(Ti-Ni)$ type. Additionally ions implantation activates cells to synthesis of alkaline phosphatase, the enzyme related to bone regeneration. Earlier investigations of this surface layer produced on titanium alloy Ti6Al4V showed that this surface layer significantly improves microhardness and corrosion resistance of the tested samples [3-5]. Further biological studies revealed higher proliferative potential of osteoblasts Saos-2 line when were cultured on surface layer $Ti_3P+(Ti-Ni)$ type in comparison to bulk material Ti6Al4V alloy and their higher biological activities in range of production of alkaline phosphatase and transforming growth factor-beta1.

Z literatury wiadomo, że implantacja jonów wapnia na stopach tytanu zwiększa jego odporność korozyjną [6] i w niewielkim stopniu zwiększa mikrotwierdność [2]. Badania biologiczne wskazują, że adhezja i proliferacja komórek na próbkach implantowanych jonami jest większa niż na materiale wyjściowym [7]. Nasze badania są zgodne z tymi obserwacjami. Biorąc pod uwagę poprawę właściwości mechanicznych i biologicznych stopu tytanu z warstwą dyfuzyjną typu $Ti_3P+(Ti-Ni)$ można spodziewać się lepszej biointegracji implantów z tą warstwą implantowaną jonami wapnia niż implantów ze stopu tytanu $Ti6Al4V$.

Podziękowania

Badania były finansowane z projektu ERA NET MNT/90/2006.

It is known from literature data that Ca ions implantation on titanium alloys significantly increases material corrosion resistance [6] and slightly microhardness [2]. Biological experiments suggest that cell adhesion and proliferation on samples ion implanted are higher than on bulk material [7]. Data of our studies are in agreement with these observations. Taking into consideration both improvement mechanical and biological properties of titanium alloy by the presence of the diffusion layer $Ti_3P+(Ti-Ni)$ type it can be expected better integration of implants with Ca ion implanted surface layer $Ti_3P+(Ti-Ni)$ type than implants made of titanium alloy.

Acknowledgments

This study was financed by project: ERA-NET MNT/90/2006.

Piśmiennictwo

- [1] Krischok S., Blank C., Engel M., Gutt R., Ecke G. et.al. Surf. Sci. 2007; 601: 3856-3860.
 [2] Ikeyama M. et.al. Surf. Coat. Tech. 128-129; 2000: 400-403.
 [3] Czarnowska E., Zajączkowska A., Godlewski M.M., Mróz W., Sobczak J., Wierzchoń T. J. Nanosci. Nanotech. 2008 (w druku).
 [4] Zajączkowska A. Praca doktorska. „Kształtowanie właściwości stopu tytanu $Ti6Al4V$ obróbką hybrydową w aspekcie zastosowań na biomateriały kostne”, 2008r.

References

- [5] Czarnowska E., Zajączkowska A., Sowińska A., Cukrowska B., Godlewski M.M., Wierzchoń T. Engin. Biomat. 2005; 46: 1-3.
 [6] Krupa D. et.al. Vacuum 63; 2001: 715-719.
 [7] Braceras I., Onate J.I., Goikoetxea L. et.al. Surf. Coat. Tech. 2005; 196: 321-326.

PARAMETRYCZNA OCENA POROWATYCH POKRYĆ IMPLANTÓW DOKOSTNYCH – PRZYKŁADOWE WYNIKI POMIARÓW REPREZENTATYWNYCH TRZPIENI ENDOPROTEZ STAWU BIODROWEGO

RYSZARD UKLEJEWSKI¹, MARIUSZ WINIECKI^{1*}, TOMASZ CZAPSKI¹, PIOTR ROGALA², JAN KOCHAŃSKI¹

¹ UNIWERSYTET KAZIMIERZA WIELKIEGO, INSTYTUT TECHNIKI, ZAKŁAD PODSTAW BIOINŻYNIERII MEDYCZNEJ, BYDGOSZCZ, POLSKA

² UNIWERSYTET MEDYCZNY IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO, KLINIKA CHIRURGII KRĘGOSŁUPA, ORTOPEDII ONKOLOGICZNEJ I TRAUMATOLOGII, POZNAŃ, POLSKA

* E-MAIL: WINIECKI@UKW.EDU.PL

[Inżynieria Biomateriałów, 77-80, (2008), 101-103]

Długotrwała wytrzymałość implantacji do układu kostnego porowatych materiałów biozastępczych zależy od: 1) efektywności adaptacyjnego wrastania tkanki kostnej do przestrzeni porów porowatego pokrycia implantu ortopedycznego oraz 2) zachowania prawidłowych relacji naprężeniowo-odkształceniowych w tkance kostnej wokół implantu. Wybrane zagadnienia dotyczące tej problematyki były przedmiotem projektu badawczego MNIŚW nr 4 T07C 056 29 pt.: „Badanie i projektowanie cech konstrukcyjnych połączeń porowatych implantów ortopedycznych z kośćmi”, jak również rozprawy doktorskiej [8]. Problem powstawania niezawodnego połączenia kości z implantem i jego dłu-

PARAMETRIC EVALUATION OF IMPLANT POROUS COATINGS – THE RESULTS FROM REPRESENTATIVE EXAMPLES OF FEMORAL STEMS MEASUREMENTS

RYSZARD UKLEJEWSKI¹, MARIUSZ WINIECKI^{1*}, TOMASZ CZAPSKI¹, PIOTR ROGALA², JAN KOCHAŃSKI¹

¹ KAZIMIERZ WIELKI UNIVERSITY, INSTITUTE OF TECHNOLOGY, DEPARTMENT OF FUNDAMENTALS OF MEDICAL BIOENGINEERING, BYDGOSZCZ, POLAND,

² POZNAŃ UNIVERSITY OF MEDICAL SCIENCES, DEPARTMENT OF SPINE SURGERY, ONCOLOGIC ORTHOPAEDICS AND TRAUMATOLOGY, POZNAŃ, POLAND

* E-MAIL: WINIECKI@UKW.EDU.PL

[Engineering of Biomaterials, 77-80, (2008), 101-103]

The long-term vitality and biomechanical strength of the porous biosubstitute materials implantation inserted into bone structure depends on: 1) the effectiveness of the adaptive bone tissue ingrowth into pores of the porous coating on orthopedic implant and 2) the proper stress-strain relations in bone tissue around the implant. Some problems concerning this were the subject of the research project no 4 T07C 056 29: “Experimental investigation and design of the constructional properties of bone-porous implant fixation”, including the PhD dissertation [8]. In frames of the research, the problem of successful integration and long-term biomechanical vitality of bone-implant interface was discussed