

PROLIFERACJA OSTEOBLASTÓW SAOS-2 ORAZ KOMÓREK ENDOTELIALNYCH EA.HY 926 NA POLEROWANYCH I PIASKOWANYCH POWIERZCHNIACH STOPÓW TYTANU Ti6Al4V I Ti6Al7Nb

M. WALKOWIAK-PRZYBYŁO^{1*}, M. WALCZYŃSKA²,
P. KOMOROWSKI², L. KLIMEK¹, B. WALKOWIAK²

POLITECHNIKA ŁÓDZKA,
INSTYTUT INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ,
UL. STEFANOWSKIEGO 1, 90-924 ŁÓDŹ, POLSKA:

¹ ZAKŁAD BADAŃ MATERIAŁÓW

² ZAKŁAD BIOFIZYKI

MAILTO:*MMWALKOWIAK@WP.PL

[Inżynieria Biomateriałów, 109-111, (2011), 39-41]

Współcześnie za najbardziej biozgodne spośród biomateriałów metalicznych uznaje się stopy na bazie tytanu. Z tego względu stanowią one wysoce atrakcyjne materiały dla zastosowań w różnych obszarach medycyny i implantologii. W ortopedii, protetyce stomatologicznej i kardiologii od lat powszechnie stosuje się stop tytanu z aluminium i wanadem, Ti6Al4V. Jednakże, według niektórych doniesień, ze względu na obecność wanadu, który okazał się toksyczny w warunkach eksploatacji implantu środowisku biologicznym, stop ten należy używać z ostrożnością. W tym kontekście duże nadzieje budzi stop tytanu Ti6Al7Nb z lepiej tolerowanym niobem, który ponadto wykazuje większą odporność na korozję, niż powszechnie stosowany stop Ti6Al4V.

W adhezji komórek do powierzchni implantów dużą rolę odgrywa topografia powierzchni, energia powierzchniowa oraz skład chemiczny. W celu oceny wpływu modyfikacji powierzchniowej stopów Ti6Al4V i Ti6Al7Nb na proliferację, przeżywalność i różnicowanie osteoblastów linii Saos-2 oraz komórek śródbłonna linii EA.hy 926, hodowle komórkowe prowadzono na dwóch rodzajach powierzchni: polerowanej i piaskowanej prezentowanych stopów tytanu. Obróbka powierzchni poprzez piaskowanie zapewnia rozwinięcie powierzchni biomateriału, a tym samym potencjalnie lepszą integrację tkankową, przy zachowaniu niskich kosztów wytworzenia zmodyfikowanej powierzchni.

Próbki z wymienionych rodzajów materiałów stanowiły krążki o wymiarach 3 mm grubości oraz 20 mm średnicy. Surowe próbki szlifowano na wodnych papierach ściernych o malejącej gradacji ziaren: 80, 260, 600, 800, 1200, a następnie polerowano zawiesiną tlenkową na bazie koloidalnego roztworu krzemionki (Struers). Część krążków poddano następnie piaskowaniu ziarnem Al₂O₃ o grubości 110 μm, padającym pod kątem 45° przy ciśnieniu 4-5 Bar. Wszystkie próbki myto w acetonie w myjce ultradźwiękowej przez 10 min, a następnie w wodzie dejonizowanej przez kolejne 10 min.

Ocenę stopnia proliferacji osteoblastów na polerowanych i piaskowanych powierzchniach Ti6Al4V i Ti6Al7Nb poprzedzono sterylizacją parową badanych krążków. Po sterylizacji próbki inkubowano przez 48h z zawiesiną osteoblastów linii Saos-2 w pełnym medium hodowlanym (McCoy's 5a Modified Medium z dodatkiem 15% płodowej surowicy bydlęcej (FBS), penicyliny i streptomycyny) w temperaturze 37°C, przy wilgotności względnej 100%, w obecności 5% CO₂. Równolegle przygotowano próby kontrolne,

PROLIFERATION OF HUMAN OSTEOBLAST-LIKE CELLS SAOS-2 AND HUMAN ENDOTHELIAL CELLS EA.HY 926 ON POLISHED AND SANDBLASTED SURFACES OF TITANIUM ALLOYS Ti6Al4V AND Ti6Al7Nb

M. WALKOWIAK-PRZYBYŁO^{1*}, M. WALCZYŃSKA²,
P. KOMOROWSKI², L. KLIMEK¹, B. WALKOWIAK²

TECHNICAL UNIVERSITY OF LODZ,
INSTITUTE OF MATERIALS SCIENCE,
1 STEFANOWSKIEGO STR., 90-924 LODZ, POLAND:

¹ DEPARTMENT OF MATERIALS' RESEARCH,

² DEPARTMENT OF BIOPHYSICS,

*MAILTO: MMWALKOWIAK@WP.PL

[Engineering of Biomaterials, 109-111, (2011), 39-41]

With their specific mechanical properties, titanium-based alloys are considered as the most biocompatible among metallic biomaterials. Thus, they constitute a very attractive materials for applications in various fields of medicine and implantology. The vast majority of implantable devices in orthopedics, dental prosthetics and cardiac surgery is made of the commonly known titanium alloy with aluminum and vanadium - Ti6Al4V. However, according to some researches, this alloy should be used with a proper care because of toxicity of vanadium during exploitation of the implant in the highly corrosive biological environment. This risk is eliminated for titanium alloy with aluminum and niobium - Ti6Al7Nb, which appears to have not only a higher biocompatibility but also increased resistance to corrosion than commonly used Ti6Al4V alloy.

Surface topography, energy and its chemical composition play a vital role in adhesion of cells to the implant's surface. To assess the influence of surface modification of Ti6Al4V and Ti6Al7Nb alloys on proliferation, viability and differentiation of osteoblastic and endothelial cells, the cells' cultures were grown on two kind of surfaces: polished and sandblasted. Sandblasting ensures, at low costs, development of biomaterial's surface and potentially better tissue integration.

Samples made of aforementioned materials were disc-shaped, 20 mm in diameter and 3 mm thick. They were grinded on abrasive papers of decreasing grain grit: 80, 260, 600, 800, 1200, then polished with silica-based paste (Struers). Additionally, some samples of each alloy were sandblasted with Al₂O₃ grains 110 μm in size which were hitting the surface at a 45° angle and a pressure of 4-5 Bar. Then all discs were cleaned in an ultrasonic bath in acetone for 10 minutes and in deionised water for the next 10 minutes.

Assessment of proliferation rate of Saos-2 cells on polished and sandblasted surfaces of Ti6Al4V and Ti6Al7Nb was preceded with steam sterilized samples. After autoclaving the samples were incubated for 48h with suspension of osteoblastic cells Saos-2 in full medium (McCoy's 5a Modified Medium supplemented with 15% fetal bovine serum (FBS), penicillin and streptomycin) at 37°C, in the atmosphere of 5% CO₂ and relative humidity 100%. Control samples were prepared as well: cells that were not in contact with any examined material (control) and cells that were grown on the surface of polished medical steel AISI 316L (reference sample). Medical steel has well-defined biological proper-

które stanowiły komórki nie poddane kontaktowi z bio-materiałem (kontrola) oraz komórki poddane kontaktowi z polerowaną powierzchnią stali medycznej AISI 316L (tzw. próbka referencyjna). Zastosowanie polerowanej stali medycznej jako standardu wewnętrznego wynika z konieczności uwzględnienia zmienności biologicznej badanych komórek, a materiał ten, dzięki wieloletnim badaniom prowadzonym w Zakładzie Biofizyki PŁ, posiada dobrze scharakteryzowane właściwości biologiczne. Po okresie inkubacji badanych próbek z zawieszoną osteoblastów przeprowadzono obserwację z użyciem mikroskopu fluorescencyjnego Olympus GX-71 i mieszaniny znaczników fluorescencyjnych calcein AM/ethidium D1 (Invitrogen), znakujących odpowiednio komórki żywe na

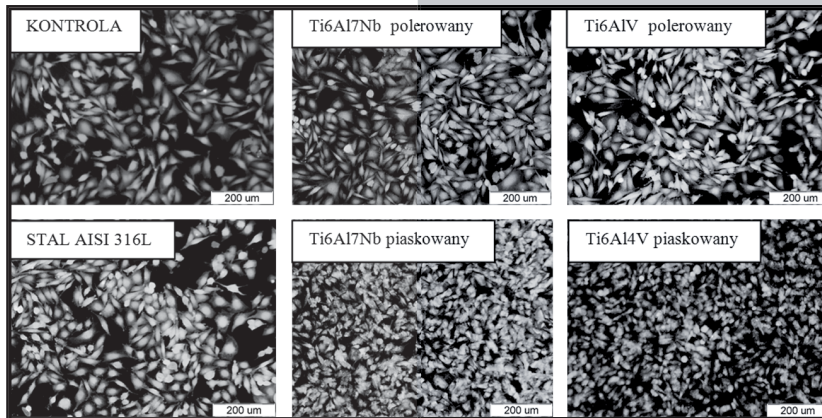
zielono i martwe na czerwono (RYS. 1 i 2).

Analogiczny eksperyment przeprowadzono z wykorzystaniem hodowli komórek śródbłonka linii Ea.hy 926 prowadzonej w Dulbecco's Modified Eagle's Medium z dodatkiem 10% FBS, glukozy, penicyliny, streptomycyny oraz HAT.

Dla obu linii komórkowych testy przeprowadzono w trzech niezależnych powtórzeniach.

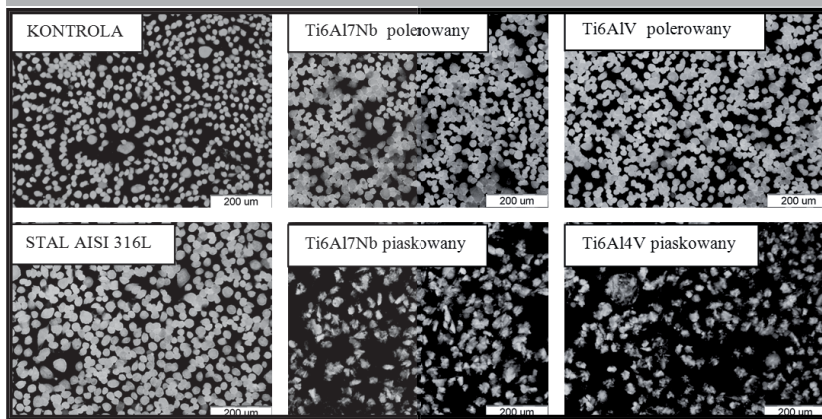
Do zliczenia całkowitej liczby komórek oraz komórek żywych i martwych na poszczególnych powierzchniach wykorzystano program Image J. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą testu jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA. W TABELI 1 przedstawiono zestawienie otrzymanych wyników z uwzględnieniem istotności statystycznej. Porównanie uzyskanych danych pozwala sformułować następujące wnioski:

- Polerowana powierzchnia stopów tytanu sprzyja zwiększonej proliferacji komórek endotelialnych, natomiast osteoblasty wykazują większą tendencję do zasiedlenia powierzchni piaskowanych.
- Najwyższy odsetek komórek martwych, zarówno osteoblastów, jak i komórek endotelium, znaleziono na piaskowanej powierzchni stopu Ti6Al4V. Dla powierzchni polerowanej Ti6Al4V tendencja ta została zaobserwowana w przypadku osteoblastów. Wyniki te potwierdzają cytotoxyczność stopu tytanu z wanadem w porównaniu do stopu tytanu z niobem.



RYS. 1. Osteoblasty Saos-2 na stopach tytanu, stali medycznej i kontroli, pow. 100x.

FIG. 1. Human osteoblasts Saos-2 on titanium alloys, medical steel and control; 100x magnification.



RYS. 2. Komórki śródbłonka EA.hy 926 na stopach tytanu, stali i kontroli, pow. 100x.

FIG. 2. Endothelial cells EA.hy 926 on titanium alloys, medical steel and control; 100x magnification.

ties and serves as the inter-laboratory standard in Department of Biophysics, assuring consideration of cells' biological variation. After incubation period the samples' surface were observed with the use of fluorescence microscope Olympus GX-71 and the mixture of fluorescent dyes: calcein AM/ethidium D1 (Invitrogen) which stain living cells green and dead cells red (FIGs.1 and 2).

A parallel experiment was conducted with the use of human endothelial cells culture line EA.hy 926 in Dulbecco's Modified Eagle's Medium supplemented with 10% FBS, penicillin, streptomycin and HAT. All of the tests were carried out in three independent experiments.

Total number of proliferating cells as well as the number of living and dead cells was counted with Image J program. Statistical

analysis was done by one-way analysis of variance (ANOVA). Obtained results with their statistical significance are collected in TABLE 1. Comparison of presented data allows to make the following conclusions:

- Polished surfaces of titanium alloys conduce highest proliferation rate of endothelial cells, whereas osteoblastic cells tend to proliferate more on sandblasted than polished surfaces.
- The highest number of dead osteoblastic as well as endothelial cells were found on sandblasted Ti6Al4V surface. For polished Ti6Al4V surface this tendency is observed for osteoblasts. These results confirm cytotoxicity of titanium-vanadium alloy when compared to titanium-niobium alloy.

Acknowledgements

This study was financially supported by „DIAHAP: New carbon-hydroxyapatite nanocomposites on metallic bases applied in medicine”.

TABELA 1. Proliferacja osteoblastów i komórek śródbłonka na badanych materiałach.
TABLE 1. Proliferation of osteoblastic and endothelial cells on examined materials.

	Kontrola Control (1)	AISI 316L (2)	Ti6Al7Nb polerowany polished (3)	Ti6Al7Nb piaskowany sandblasted (4)	Ti6Al4V polerowany polished (5)	Ti6Al4V sandblasted (6)	Istotność Significance (Test ANOVA)
Proliferacja osteoblastów Saos-2 / Proliferation of osteoblasts Saos-2							
Całkowita liczba komórek w polu widzenia (pow. 100x) Total number of cells at 100x magnification	694 ± 307 (100%)	647 ± 309 (100%)	791 ± 323 (100%)	866 ± 294 (100%)	607 ± 248 (100%)	764 ± 225 (100%)	4-5 p<0,05 pozostałe: p>0,05
Liczba i procent komórek żywych Number and percent of living cells	675 ± 298 (97,2%)	628 ± 301 (97,1%)	771 ± 316 (97,4%)	846 ± 289 (96,7%)	587 ± 241 (96,7%)	730 ± 208 (95,6%)	4-5 p<0,05 pozostałe: p>0,05
Liczba i procent komórek martwych Number and percent of dead cells	19 ± 11 (2,8%)	19 ± 9 (2,9%)	20 ± 10 (2,6%)	20 ± 11 (2,3%)	20 ± 17 (3,3%)	34 ± 20 (4,4%)	1-6, 2-6 p<0,01 3-6,5-6,4-6 p<0,05 pozostałe: p>0,05
Proliferacja komórek śródbłonka EA.hy 926 / Proliferation of endothelial cells EA.hy 926							
Całkowita liczba komórek w polu widzenia (pow. 100x) Total number of cells at 100x magnification	591 ± 240 (100%)	600 ± 272 (100%)	833 ± 202 (100%)	492 ± 183 (100%)	849 ± 182 (100%)	569 ± 150 (100%)	1-3,1-5,2-5,3-4,3-6,4-5,5-6 p<0,001 2-3 p<0,01 pozostałe: p>0,05
Liczba i procent komórek martwych Number and percent of dead cells	575 ± 240 (97,3%)	588 ± 270 (97,9%)	817 ± 203 (98%)	478 ± 181 (97,3%)	832 ± 180 (98%)	551 ± 149 (96,8%)	1-3,1-5,2-5,3-4,3-6,4-5, 5-6 p<0,001 2-3 p<0,01 pozostałe: p>0,05
Liczba i procent komórek martwych Number and percent of dead cells	16 ± 6 (2,7%)	13 ± 4 (2,1%)	16 ± 7 (2%)	13 ± 8 (2,7%)	17 ± 7 (2%)	18 ± 5 (3,2%)	4-6 p<0,05 pozostałe: p>0,05

Podziękowania

Badania finansowane w ramach projektu „DIAHAP: New carbon-hydroxyapatite nanocomposites on metallic bases applied in medicine”.