

OCENA TROMBOGENNOŚCI POWIERZCHNI POLEROWANEGO STOPU TYTANU Ti6Al7Nb MODYFIKOWANEGO CIENKĄ WARSTWĄ FOSFORANU WAPNIA

M. WALKOWIAK-PRZYBYŁO^{1*}, W. OKRÓJ², M. WALCZYŃSKA²,
P. SKWIERCZYŃSKI³, B. WALKOWIAK²

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

¹ ZAKŁAD BADAŃ MATERIAŁÓW,

² ZAKŁAD BIOFIZYKI,

³ ZAKŁAD INŻYNIERII BIOMEDYCZNEJ,

*MAILTO: MMWALKOWIAK@WP.PL

[Inżynieria Biomateriałów, 109-111, (2011), 37-38]

Tytan oraz jego stopy są materiałami szeroko wykorzystywanymi w implantologii. Ostatnio wprowadzony stop Ti6Al7Nb charakteryzuje się dużą odpornością na korozję i nie wykazuje reakcji uczuleniowych i toksycznych. Podwyższenie biokompatybilności oraz osteointegracji stopu Ti6Al7Nb można uzyskać wytwarzając cienką warstwę fosforanu wapnia (CAP) na powierzchni implantu. Materiał ten stanowi mineralne rusztowanie dla tkanki i przyczynia się do łatwiejszego i szybszego integrowania się z kością. Niemal wszystkie implanty, w tym implanty kostne, mają pierwotny, bezpośredni kontakt z płynami biologicznymi, w szczególności z krwią. Dobre ukrwienie sąsiadujących z implantem tkanek zapewnia optymalne funkcjonowanie wszczepu. Adhezja płytek krwi do powierzchni implantu jest jednym z pierwszych etapów kontaktu biomateriału z krwią. Płytki krwi, w wyniku adhezji przybierają formy morfologiczne odpowiadające narastającej ich aktywacji. Początkowo prezentują kształt dyskooidalny, następnie przyjmują formy dendrytyczne lub całkowicie rozpostarte. Kontaktujące się z powierzchnią implantu krwinki płytkowe ulegają pobudzeniu i mogą adherować do powierzchni, ale też z różnych powodów mogą pozostać w krążeniu gdzie wykazują stan spontanicznej aktywacji i agregacji. Niesie to ze sobą ryzyko pobudzenia układu krzepnięcia.

Próbki ze stopu Ti6Al7Nb wykonano w formie krążków o wymiarach 3 mm grubości oraz 8 mm średnicy. Surowe próbki szlifowano na wodnych papierach ściernych o malejącej gradacji ziaren: 80, 260, 600, 800, 1200, a następnie polerowano zawiesiną na bazie koloidalnego roztworu krzemionki (Struers). W dalszym etapie wydzieloną grupę krążków ze stopu Ti6Al7Nb pokryto cienką warstwą fosforanu wapnia. Do tego celu wykorzystano metodę zmiennoprądowego rozpylania magnetronowego (AC-MS). Równoległe przygotowano próbkę referencyjną, którą stanowił krążek polerowanej stali medycznej AISI 316L o dobrze scharakteryzowanych właściwościach biologicznych, pełniący rolę standardu wewnętrznego w Zakładzie Biofizyki PŁ. W badaniach przeprowadzonych z wykorzystaniem cytometru przepływowego dodatkowo wprowadzono jako kontrolę pełną krew, która nie została poddana kontaktowi z żadnym z biomateriałów.

W celu oceny stopnia zaadherowania płytek krwi do powierzchni badanych materiałów próbki poddano inkubacji przez 1h w pełnej krwi cytrynianowej w 37°C, zapewniając rotacyjny ruch próbek zawierających krew i badany materiał. Następnie krążki płukano dwukrotnie w buforze fosfo-

THROMBOGENICITY OF THIN LAYER CALCIUM PHOSPHATE CREATED ON POLISHED SURFACE OF Ti6Al7Nb ALLOY

M. WALKOWIAK-PRZYBYŁO^{1*}, W. OKRÓJ², M. WALCZYŃSKA²,
P. SKWIERCZYŃSKI³, B. WALKOWIAK²

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

¹ DEPARTMENT OF MATERIALS' RESEARCH,

² DEPARTMENT OF BIOPHYSICS,

³ DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING,

*MAILTO: MMWALKOWIAK@WP.PL

[Engineering of Biomaterials, 109-111, (2011), 37-38]

Titanium and its alloys are among the most wide-spread materials used in implantology. Recently introduced Ti6Al7Nb alloy has a high resistance to corrosion and it does not show any allergic and toxic reactions. Increase of its biocompatibility and osseointegration can be achieved by production of thin layer of calcium phosphate (CAP) on the implant's surface. This material acts as mineral scaffolding for tissues and it contributes to easier and faster integration with bone. Almost all implants, including bone's implants, have primeval direct contact with biological fluids, especially with blood. Appropriate blood supply to implant surrounding tissues ensures optimal functioning of this implant. Adhesion of blood platelets to the implant's surface is one of the first step of biomaterial-blood interaction. As a result of adhesion, platelets form a differential morphological shapes corresponding to the level of their activation. Initially, they represent discoidal shape, then they reach dendritic forms or become completely spread. Platelets that had a contact with implant's surface can easily become stimulated and may adhere to the surface, but, for some reasons, they can also stay in circulation system, where they indicate the state of spontaneous activation and aggregation. This increases the risk of activation of the coagulation system.

Samples made of Ti6Al7Nb alloy were discs-shaped, 8 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). Then, some samples were covered with thin layer of calcium phosphate (CAP). To achieve this aim AC Magnetron Sputtering (AC – MS) method was used. At the same time a reference sample, which was a polished medical steel AISI 316L, was prepared. Medical steel has well-defined biological properties and serves as the inter-laboratory standard in Department of Biophysics, Technical University of Lodz. Additionally, for the flow cytometry experiments, among material contacting blood samples, the whole blood free from any contact with examined materials was used as a control sample.

In order to evaluate the rate of blood platelets' adhesion to the biomaterials' surfaces, the materials were incubated with the whole citrated blood for one hour at 37°C, ensuring end-to-end move of tubes containing blood and examined biomaterials. Then, the samples were washed twice with phosphate buffer and fixed in 2,5% glutaraldehyde solution for 1 hour at 4°C. The next step was dehydration of examined surfaces in gradually increasing concentration of ethanol (50%, 70%, 80%, 90%, ABS) Surfaces of air-dried samples were observed with the use of fluorescence microscope Olympus GX-71.

ranowym i utrwalono w 2,5% roztworze glutaraldehydu przez 1h w 4°C. Kolejnym etapem było odwodnienie badanych powierzchni w etanolu o wzrastającym stężeniu (50%, 70%, 80%, 90%, ABS), następnie próbki suszono i poddano obserwacji w mikroskopie fluorescencyjnym Olympus GX-71 (FIG.1)

Do zliczenia płytek krwi adherowanych do poszczególnych powierzchni wykorzystano program Image J. Otrzymałe wyniki zestawiono w TABELI 1.

Do oceny aktywacji oraz agregacji krwinek płytkowych we krwi podanej kontaktowi z badanymi biomateriałami zastosowano cytometrię przepływową wraz z fluorescencyjnie znakowanymi przeciwciałami: CD-61, CD-62 i PAC-1. Próbkę krwi utrwalono w Cell-fix i pozostawiono na 12h w 4°C. Ekspresję aktywnego receptora fibrynogeny na powierzchni płytek krwi badano z użyciem znakowanych FITC przeciwciał PAC-natomiast ekspresję selektyny P oceniano przy użyciu znakowanych PE przeciwciał CD62. Wyniki zestawiono w TABELI 2.

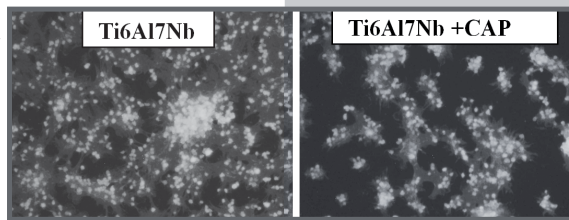
Agregację płytek w pełnej krwi badano rejestrując w cytometrze światło rozproszone do przodu i w bok. Na uzyskanych wykresach kropkowych wyodrębniono obszar zajmowany przez pojedyncze płytki (obszar R1) oraz przez płytki tworzące agregaty (obszar R2). Wyniki te zestawiono w TABELI 3.

Na podstawie uzyskanych wyników sformułowano następujące wnioski:

- Powierzchnie Ti6Al7Nb oraz Ti6Al7Nb pokryta fosforem wapnia wykazują znaczną trombogeniczność (widoczne masywne agregaty płytkowe).
- Nie zaobserwowano zmian w ekspresji aktywnego receptora dla fibrynogeny w próbkach krwi poddanych kontaktowi ze stopem Ti6Al7Nb. Natomiast ekspresja selektyny P była w tym przypadku znacząco wyższa niż w próbkach kontrolnych.
- Próbka Ti6Al7Nb+HPA powodowała bardzo znaczący wzrost ekspresji zarówno aktywnego receptora fibrynogeny, jak i selektyny P.
- Badane materiały mają nieznaczny wpływ na spontaniczną agregację płytek krwi

Podziękowania

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



RYS. 1. Agregaty płytkowe zaadherowane do powierzchni badanych materiałów, mikroskop fluorescencyjny, pow. 500x.

FIG. 1. Aggregates of blood platelets adhered to the surface of examined biomaterials observed in fluorescence microscope, magnification 500x.

TABELA 1. Liczba płytek przypadająca na 100 um² powierzchni dla stopów tytanu z niobem, stopu pokrytego warstwą fosforanu wapnia oraz stali medycznej AISI 316 L.

TABLE 1. Number of blood platelets adhered to surfaces of Ti6Al7Nb alloy and its modified surface covered with thin layer of calcium phosphate presented as a percent of reference sample made of medical steel AISI 316 L.

Liczba płytek krwi na 100 μm ² % stali medycznej Percent of reference sample [%]	AISI 316 L	Ti6Al7Nb	Ti6Al7Nb+CAP
	100,0 ± 35,3	99,2 ± 23,9	91,9 ± 90,0

TABELA 2. Aktywacja płytek krwi. Wyniki przedstawiono jako % kontroli.

TABLE 2. Activation of blood platelets. Results are presented as % of control.

Przeciwciała / Antibodies	Mediana / Median (% of control)	
	PAC-1/FITC	anty CD62/PE
1. kontrola \ control	100,0	100,0
2. AISI 316	168,2	122,6
3. Ti6Al7Nb	99,1	140,8
4. Ti6Al7Nb+CAP	247,4	188,3

TABELA 3. Agregacja płytek krwi – wyniki przedstawiono jako % populacji płytek krwi.

TABLE 3. Aggregation of blood platelets – results shown as a % of blood platelets' population.

	Kontrola Control	AISI 316	Ti6Al7Nb	Ti6Al7Nb + CAP
R1	84,5	84,0	75,6	82,2
R2	12,3	12,8	13,0	13,3

The total number of platelets adhered to examined surfaces was counted with the use of Image J program. The data are collected in TABLE 1.

In order to evaluate activation and aggregation of blood platelets in blood that had a contact with examined biomaterials, the flow cytometry with fluorescence labeled antibodies: CD-61, CD-62 and PAC-1 was used. Samples of blood were fixed in Cell-fix and incubated

for 12 h at 4°C. The expression of active fibrinogen receptor on the blood platelets' surfaces was studied using PAC-1 antibody labeled with FITC, and the expression of selectin P was evaluated using CD62 antibody labeled with PE.

The results of this experiment are presented in TABLE 2.

Aggregation of blood platelets was evaluated by recording the light, which was forward, and side scattered in cytometer. In the obtained dot-plots (data not shown) the areas with single platelets (area R1) and with platelets forming aggregates (area R2) were separated. The results are shown in TABLE 3.

On the grounds of obtained results the following conclusions were made:

- The surfaces of Ti6Al7Nb and Ti6Al7Nb with calcium phosphate layer seem to be highly thrombogenic (the huge platelets' aggregates were easily noticed), although the

number of adhered does not differentiate the examined samples.

- The changes in expression of active fibrinogen's receptor in the blood samples that had a contact with Ti6Al7Nb alloy were not observed, whereas the expression of selectin P was, in that case, significantly higher than in control samples.
- Ti6Al7Nb+CAP caused significant increase in the expression of both active fibrinogen receptor and selectin P.
- Examined materials have insignificant influence on spontaneous aggregation of blood platelets.

Acknowledgements

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