

- [1] Daniel M., Antolic V., Iglic A., Kralj-Iglic V.: Determination of contact hip stress from nomograms based on mathematical model. *Medical Eng. & Physics* 23 (2001) 347-357.
- [2] Włodarski J., Szarek A.: Analiza naprężeń i odkształceń w układzie kość - implant. *Biomechanics* 2003, Poznań, 557-562
- [3] Będziński R.: *Biomechanika inżynierska. Zagadnienia wybrane.* Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław, 1997.
- [4] Łachwa A.: Rozmyty świat zbiorów, liczb, relacji, faktów, reguł i decyzji. *Problemy współczesnej nauki, teoria i zastosowania.* Akad. Oficyna Wyd. EXIT, Warszawa, 2001.
- [5] Jang R., Gulley N.: *Fuzzy Logic Toolbox User's Guide.* The MathWorks, Inc. 1995.
- [6] Czajkowski A., Cwanek J., Czajkowska M.: Stress values in the range of Wiberg angle of endoprosthesis cup in dependence from body weight of patient. *Mechanika w medycynie* 6, Rzeszów, 2002.

- [7] Mavcic B., Pompe B., Antolic V., Daniel M., Iglic A., Kralj-Iglic V.: Mathematical estimation of stress distribution in normal and dysplastic human hips. *J. of Orthopaedic Research* 20 (2002) 1025-1030.
- [8] Genda E., Iwasaki N., Li G., MacWilliams B.A., Barrance P.J., Chao E.: Normal hip joint contact pressure distribution in single-leg standing-effect of gender and anatomic parameters. *J. of Biomechanics* 34 (2001) 895-905.
- [9] Iglic A., Kralj-Iglic V., Daniel M., Macek-Lebar A.: Computer Determination of Contact Stress Distribution and Size of Weight Bearing Area in Human Hip Joint. *Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Eng.*5(2) (2002) 185-192.

WPŁYW STERYLIZACJI NA WŁAŚCIWOŚCI BIOLOGICZNE WARSTW AZOTOWANYCH WYTWORZONYCH NA STOPIE TYTANU Ti6Al4V W WARUNKACH WYŁADOWANIA JARZENIOWEGO

SOWIŃSKA A.*, ZAJĄCZKOWSKA A.*, CUKROWSKA B.*,
GODLEWSKI M.M.***, WIERZCHOŃ T.***, CZARNOWSKA E.*

*ZAKŁAD PATOLOGII, INSTYTUT – POMNIK CENTRUM ZDROWIA
DZIECKA
04-730 WARSZAWA, AL. DZIECI POLSKICH 20,
**WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ,
POLITECHNIKA WARSZAWSKA,
02-507 WARSZAWA, WOŁOSKA 141,
***WYDZIAŁ MEDYCYN Y WETERYNARYJNEJ,
SZKOŁA GŁÓWNA GOSPODARSTWA WIEJSKIEGO,
02-787 WARSZAWA,
UL. NOWOURSYNOWSKA 166
E-MAIL: CZARNOWSKA@CZD.WAW.PL

[*Inżynieria Biomateriałów, 58-60, (2006),200-202*]

Wstęp

Sterylizacja stanowi ostatni etap poprzedzający wszczepienie implantu do organizmu. Z danych literaturowych jest wiadomo, że sterylizacja plazmowa powoduje m.in. wzrost energii powierzchniowej i przyczynia się do zmniejszenia grubości warstwy tlenkowej na powierzchni materiału [1,2]. Natomiast zastosowanie autoklawu wpływa na wzrost warstwy tlenkowej oraz zmiany składu chemicznego powierzchni sterylizowanych materiałów [3,4]. Procesy sterylizacyjne poprzez zmianę właściwości powierzchni biomateriałów mogą wpływać na ich oddziaływanie z otaczającym środowiskiem biologicznym, a przez to decydować o dobrej integracji wszczepu z tkankami. Celem przeprowadzanych badań była ocena wpływu sterylizacji na biogodność stopu tytanu z wytworzoną w warunkach wyładowania jarzeniowego warstwą $TiN+Ti_2N+\alpha Ti(N)$ z ludzkimi fibroblastami w warunkach *in vitro* pod kątem adhezji komórkowej do próbek oraz aktywności biologicznej zaadherowanych komórek.

THE EFFECT OF STERILIZATION ON BIOLOGICAL PROPERTIES OF NITRIDED SURFACE LAYERS PRODUCED ON THE Ti6Al4V ALLOY UNDER GLOW DISCHARGE CONDITIONS

SOWIŃSKA A.*, ZAJĄCZKOWSKA A.*, CUKROWSKA B.*,
GODLEWSKI M.M.***, WIERZCHOŃ T.***, CZARNOWSKA E.*

*PATHOLOGY DEPT., THE CHILDREN'S MEMORIAL HEALTH INSTITUTE,
04-730 WARSAW, AL. DZIECI
POLSKICH 20
**FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND ENGINEERING,
WARSAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,
02-507, WARSAW, WOŁOSKA 141,
***FACULTY OF VETERINARY MEDICINE,
WARSAW AGRICULTURAL UNIVERSITY,
02-787 WARSAW, NOWOURSYNOWSKA 166
E-MAIL: CZARNOWSKA@CZD.WAW.PL

[*Engineering of Biomaterials, 58-60, (2006),200-202*]

Introduction

Sterilization is the final step of implant preparation before surgery takes place. It is known from literature that plasma sterilization causes of an increase surface energy and contribute to the decrease thickness of oxide layer on the material surface [1,2]. Autoclaving effects the increase of oxide layer thickness and change in chemical composition of sterilized material surfaces [3, 4]. Sterilization may optimise interactions of biomaterial with tissue by mean of change in its physico-chemical properties. Thus, it may improve the ability of biomaterial to integrate with a graft. In this study we investigated the effect of sterilization on biological properties of titanium alloy with nitrided surface layer $TiN+Ti_2N+\alpha Ti(N)$ produced under glow discharge conditions using human fibroblasts in term cell adhesion and physiological behaviour of adhered cells.

Materiały i metody

Wytwarzanie warstwy azotowanej

Badaniom poddano próbki ze stopu tytanu Ti6Al4V azotowane w warunkach wyładowania jarzeniowego w temperaturze 850°C, w atmosferze azotu, przy ciśnieniu 4 hPa. Próbki były płukane w alkoholu i w wodzie destylowanej, a następnie sterylizowane plazmowo w jednym cyklu (Sterrad 100 - H₂O₂, 54°C, 7hPa, 1h) lub w autoklawie w dziesięciu cyklach (para wodna, 134 °C, 1400hPa, 30min.).

Charakterystyka warstwy powierzchniowej

Wytworzone warstwy były poddane badaniom mikrostruktury (mikroskop metalograficzny Neophot 21), składu fazowego (dyfraktometr rentgenowski Philips, typ PW 1830) i chropowatości powierzchni (profilometr skanujący Form Talysurf Series 2).

Badania biologiczne.

Fibroblasty z ludzkiej skóry inkubowano na badanych próbkach przez 48 godzin według wcześniej opisanej procedury [5]. Analizowano liczbę zaadherowanych komórek, ich rozmieszczenie na próbkach, ekspresję fibronektyny i jej receptora $\alpha 5\beta 1$ oraz produkcję cytokin prozapalnych TNF α , IL1 β , IL6. W badaniach zastosowano laserowy cytometr skaningowy (LSC, CompuCyte) i mikroskop konfokalny (FV-500 system; Olympus).

Wyniki i dyskusja

Analiza mikrostruktury próbek azotowanych jarzeniowo wykazała obecność warstwy azotowanej o grubości około 40 μ m. W oparciu o badania składu fazowego stwierdzono obecność powierzchniowej fazy azotku tytanu (TiN) o grubości 4 μ m. Badania profilometryczne wykazały, że chropowatość powierzchni warstw azotowanych nieznacznie zwiększała się po sterylizacji plazmowej (RYS.1B), natomiast ulegała obniżeniu po sterylizacji w autoklawie (RYS.1C).

W badaniach poziomu cytokin prozapalnych uwalnianych do medium inkubacyjnego w hodowlach fibroblastów – bez względu na sposób sterylizacji - nie stwierdzono obecności TNF α , śladowe ilości IL1 β oraz niski poziom IL6, który obniżał się po 48h inkubacji.

Procesy sterylizacji zmieniając właściwości powierzchni biomateriałów wpływały na rozmieszczenie komórek zaadherowanych na próbkach. W hodowlach prowadzonych na próbkach sterylizowanych plazmowo 1x komórki były rozproszone na całej powierzchni biomateriału, podczas gdy na sterylizowanych w autoklawie 10x komórki tworzyły skupienia. Najwięcej komórek zaadherowało na próbkach azotowanych jarzeniowo poddanych sterylizacji plazmowej

Materials and methods

Nitrided surface layer preparation

The study was conducted on the Ti6Al4V alloy specimens nitrided under glow discharge conditions at temperature of 850°C, in atmosphere of nitrogen and under 4 hPa pressure. Samples were cleaned with ethanol and destiluted water and sterilised in plasma (Sterrad 100; H₂O₂, 54°C, 7hPa, 1h) for one cycle or in autoclave (steam, 134 °C, 1400hPa, 30min.) for ten cycles.

Surface layer characteristics

The surface layers were examined for their microstructure (Neophot 2 microscope), phase composition (x-ray diffractometer Philips PW 1830), surface topography (scanning profilometer Form Talysurf Series 2).

Cell behaviour

Human skin fibroblasts were cultured for 48 hours on samples according to previously described methods [5]. Number of adhered cells, cell arrangement, fibronectin and fibronectin receptor $\alpha 5\beta 1$ expression, and proinflammatory cytokine (TNF- α , IL-1 β , IL-6) production were analysed. These were examined by laser scanning cytometry (LSC, CompuCyte) and confocal microscopy (FV-500 system; Olympus).

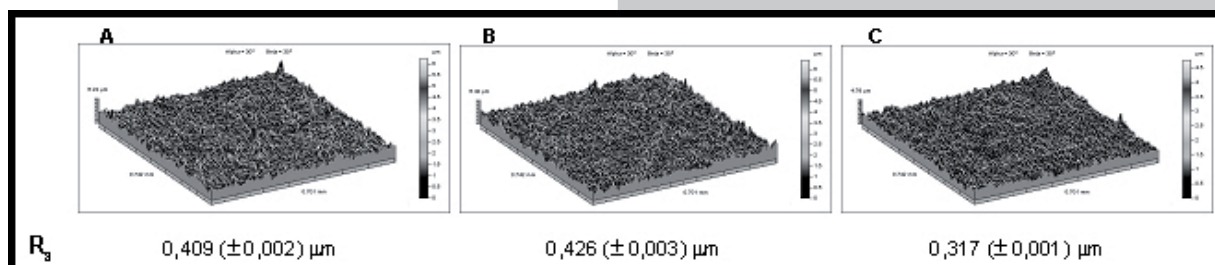
Results and discussion

Analysis of microstructure showed the nitrided surface layers were about 40 μ m thickness. Study of phase composition indicated an external phase of titanium nitride (TiN) was about 4 μ m thickness. Profilometric studies showed that the roughness of nitrided surface layers increased after plasma sterilization (FIG.1B) and decreased after steam autoclaving (FIG.1C).

No TNF- α , a traced amount of IL-1 β and low level of IL-6 (decreasing after 48h of incubation) were found in culture medium, regardless of sterilization type.

Sterilization processes changing properties of the biomaterial surface affected the cell spreading and activity. In cultures on plasma sterilized samples, cells were diffused on entire biomaterial surface, while on autoclave sterilized formed clusters. The highest number of cells adhered on plasma sterilized samples (FIG.2).

Adhered cells produced and secreted fibronectin, an important protein in cell adhesion, which formed fibrillar biofilm on a material surface. Fibroblasts cultured on plasma sterilized samples showed higher expression of fibronectin (FIG.3A) than those on autoclave sterilized. In contrast, a fibronectin receptor was higher expressed by cells adhered on autoclave sterilized samples, than sterilized by plasma

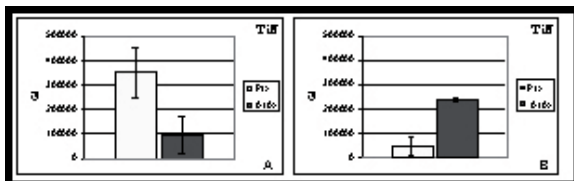


RYS.1. Chropowatość warstw azotowanych: niesterylizowanych (A), sterylizowanych plazmowo 1x (B), sterylizowanych w autoklawie 10x (C); R_a – średnia arytmetyczna odchylenia profilu chropowatości.

FIG.1. The roughness of nitrided surface layers: unsterilized (A), plasma sterilized 1x (B), after steam autoclaving 10x (C); R_a – arithmetic mean deviation.

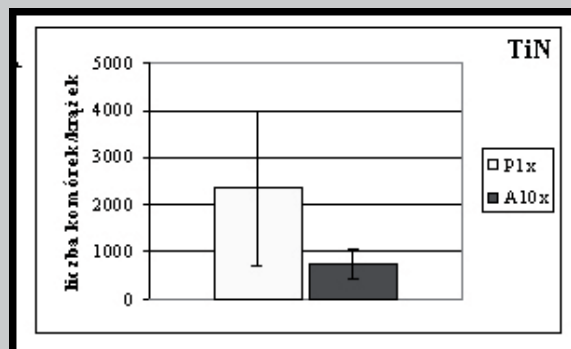
(RYS.2).

Zaadherowane komórki produkowały i wydzielały fibronektynę – białko odgrywające znaczącą rolę w adhezji komórkowej - która tworzyła włóknkowy biofilm na powierzchni materiału. Większą ekspresją fibronektyny charakteryzowały się fibroblasty hodowane na próbkach sterylizowanych plazmowo (RYS.3A). Natomiast komórki zaadherowane na próbkach sterylizowanych w autoklawie wykazywały największą ekspresję receptora dla fibronektyny (RYS.3B). Przeprowadzone badania wykazały, że sposób sterylizacji wpływa na właściwości warstwy azotowanej, a przez to oddziałuje na adhezję i aktywność biologiczną zaadherowanych na niej komórek. Nierównomierne rozmieszczenie fibroblastów na powierzchni TiN po sterylizacji w autoklawie 10x prawdopodobnie było spowodowane występowaniem na niej osadów pochodzących z atmosfery sterylizatora, przyczyniających się do wygładzenia powierzchni próbek. Jednocześnie na tak sterylizowanych materiałach obserwowano mniejszą liczbę komórek, które charakteryzowały się niższą ekspresją fibronektyny. Obserwowana w tych populacjach ekspresja receptora dla fibronektyny prawdopodobnie wiązała się z różną aktywnością proliferacyjną komórek. Wysoka ekspresja fibronektyny w hodowłach prowadzonych na próbkach TiN sterylizowanych plazmowo mogła być wynikiem podwyższenia energii i zwilżalności ich powierzchni. Jest to zgodne z obserwacjami innych badaczy [6, 7]. Fibroblasty inkubowane na próbkach TiN po sterylizacji plazmowej, choć charakteryzowały się niższą ekspresją receptora $\alpha 5\beta 1$, wykazywały większą aktywność proliferacyjną. W świetle uzyskanych wyników wydaje się, iż sterylizacja plazmowa jest najbardziej optymalnym sposobem sterylizacji biomateriałów tytanowych z warstwą TiN.



RYS.3. Poziom ekspresji fibronektyny (A) i jej receptora $\alpha 5\beta 1$ (B) w fibroblastach hodowanych na próbkach azotowanych jarzeniowo (TiN) po sterylizacji plazmowej 1x (P1x) lub w autoklawie 10x (A10x)

FIG.3. Expression of fibronectin (A) and fibronectin receptor $\alpha 5\beta 1$ (B) in fibroblasts cultured on plasma sterilized 1x (P1x) or autoclave sterilized 10x (A10x) samples.



RYS.2. Histogram liczby komórek zaadherowanych na próbkach TiN sterylizowanych plazmowo 1x (P1x) lub w autoklawie (A10x). Pole powierzchni krążka 50,24 mm².

FIG.2. Number of adhered cells on plasma sterilized 1x (P1x) or in autoclave 10x (A10x) TiN samples. The surface disc 50,24 mm².

(FIG.3B).

Sterilization processes influenced cells adhesion and behaviour by changing properties of the nitrided surface layer. Irregular spreading fibroblasts on autoclave sterilized samples with TiN surface layer probably was caused by precipitates, which arised from atmosphere of sterilizator. Presence of precipitates led to smoothing of the sample surface. Summarising these observations, it can not be excluded that high expression of fibronectin receptor caused lower cell proliferation and activity in range of fibronectin synthesis and release.

Contradictionaly, cells in population cultured on plasma sterilized samples were characterized by high expression of fibronectin. This could be a result of high energy and wettability of biomaterial surface, which is in line with observations of other investigators [6, 7]. However expression of an integrin receptor $\alpha 5\beta 1$ on cells incubated on plasma sterilized samples was low, the cells exhibited a high proliferation activity.

In conclusion, our results showed that plasma sterilization is the most optimal type of sterilization of titanium biomaterial with TiN – outer zone of the produced surface layer.

Piśmiennictwo

- [1] Swart K.M., Keller J.C., Wightman J.P., Draughn R.A., Stanford C.M., Michaels C.M. *J. Oral Implant.* 1992; 18: 130-137
- [2] Thierry B., Tabrizian M., Savadogo O., Yahia L'H. *J. Biomed. Mater. Res.* 2000; 49: 88-98
- [3] Kaluber C., Lenz L.J., Henry P.J. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* 1990; 5(3): 264-271
- [4] Vezeau P.J., Koobusch G.F., Draughn R.A., Keller J.C. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 1996; 54: 738-746

References

- [5] Czarnowska E, Sowińska A, Cukrowska B, Godlewski M, Wierchoń T. *Ann. Transplant.* 2004; 9(1A): 72-75
- [6] Altankov G., Grinnell F., Groth T. *J. Biomed. Mater. Res.* 1996; 30: 385-391
- [7] Baier R.E., Meyer A.E. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* 1988; 3: 9-20