

BIOSGODNOŚĆ WARSTWY KOMPOZYTOWEJ TYPU $Ti_3P+Ti-Ni$ Z POWŁOKĄ HYDROKSYAPATYTU

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

*ZAKŁAD PATOLOGII,
INSTYTUT – POMNIK CENTRUM ZDROWIA DZIECKA,
04-730 WARSZAWA, AL. DZIECI POLSKICH 20,
**WYDZIAŁ MEDYCYNY WETERYNARYJNEJ,
SZKOŁA GŁÓWNA GOSPODARSTWA WIEJSKIEGO,
02-787 WARSZAWA, UL. NOWOURSYNOWSKA 166
***WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ,
POLITECHNIKA WARSZAWSKA,
02-507 WARSZAWA, WOŁOSKA 141,
****INSTYTUT OPTOELEKTRONIKI WAT,
UL. GEN. S. KALIŃSKIEGO 2, 00-908 WARSZAWA,
E-MAIL: CZARNOWSKA@CZD.PL

[Inżynieria Biomateriałów, 58-60,(2006),212-214]

Wstęp

Wcześniejsze badania warstwy kompozytowej typu $Ti_3P+Ti-Ni$ na stopie $Ti6Al4V$ wykazały, że warstwa ta poprawia odporność na zużycie przez tarcie i eliminuje uwalnianie składników stopu do środowiska biologicznego [1-3]. Wskazują one również, że zewnętrzna warstwa Ti_3P ma odpowiednio rozwiniętą powierzchnię dla dobrej adhezji komórek i zachowania ich wysokiej aktywności biologicznej.

Wiadomo, że biofunkcyjność powierzchni biomateriałów tytanowych stosowanych na implanty kostne można poprawić poprzez zastosowanie warstwy hydroksyapatytu (HA), o grubości około 50 μm i o określonej topografii powierzchni i zawartości fazy krystalicznej. Jednak słaba adhezja HA do powierzchni biomateriału ogranicza korzyści kliniczne jego zastosowania. Dlatego też celem niniejszej pracy było wytworzenie cienkiej warstwy HA na kompozytowej warstwie typu $Ti_3P+Ti-Ni$ dla poprawy wrastania wszczepu w kość.

Materiały i metody

Na dyskach wykonanych ze stopu tytanu $Ti6Al4V$ o średnicy 8 mm i grubości 0,8 mm wypolerowanych papierem ściernym o gradacji 1000, osadzono metodą bezprądową warstwę niklowo-fosforową. Następnie próbki poddano działaniom wyładowania jarzeniowego [1-3]. Hydroksyapatyt nanoszono na powierzchnie Ti_3P metodą PLD (ang. Pulsed Laser Deposition) przez tytanową siatkę z otworami o średnicy $\Phi \sim 1$ mm. Morfologię wytworzonej warstwy kompozytowej badano w elektronowym mikroskopie skaningowym, topografię za pomocą mikroskopu sił atomowych (AFM, Digital Instruments Multi Mode). Biosgodność wytworzonej warstwy z komórkami linii osteoblastów Saos-2 (ATCC) badano w 48 godz. hodowli zgodnie z wcześniej opisaną procedurą postępowania [4,5]. Aktywność biologiczną, adhezję i rozmieszczenie komórek oraz produkcję fibronektyny i ekspresję receptora fibronektyny ($\alpha 5\beta 1$) analizowano technikami mikroskopii konfokalnej (FV-500 system, Olympus). Ekspresję badanych białek mierzono za pomocą programu morfometrycznego Cell P (Olympus).

BIOCOMPATIBILITY OF COMPOSITE LAYER $Ti_3P+Ti-Ni$ WITH COATING OF HYDROXYAPATITE

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

*PATHOLOGY DEPARTMENT,
THE CHILDREN'S MEMORIAL HEALTH INSTITUTE,
AL. DZIECI POLSKICH 20, 04-730 WARSZAWA,
**FACULTY OF VETERINARY MEDICINE,
WARSAW AGRICULTURAL UNIVERSITY,
NOWOURSYNOWSKA 166, 02-787 WARSZAWA
***FACULTY OF MATERIALS SCIENCES AND ENGINEERING,
WARSAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,
WOŁOSKA 141, 02-507 WARSZAWA
****INSTITUTE OF OPTOELECTRONICS
MILITARY UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, 0
1-489 WARSZAWA
E-MAIL: CZARNOWSKA@CZD.PL

[Engineering of Biomaterials, 58-60,(2006),212-214]

Introduction

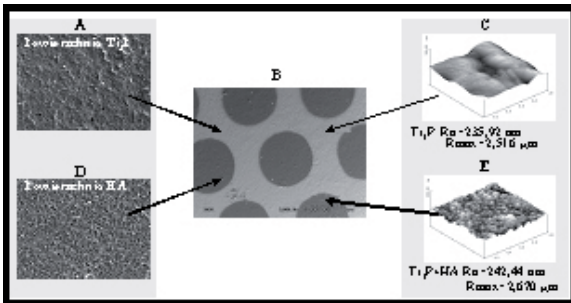
In our previous study it was shown, that the composite surface layers $Ti_3P+Ti-Ni$ type produced on $Ti6Al4V$ titanium alloy improves wear resistance of the surface and eliminates release of titanium alloy elements into biological environment [1-3]. The human osteoblast-like cells Saos-2 cultured on the Ti_3P surface showed high cell viability and only single dead cells in the cell population adhered to the material surface were observed.

Actually it is known that thickness (about 50 μm) coatings of hydroxyapatite (HA) produced on titanium alloy improve biocompatibility and tissue ingrowth on bone implants. However, poor adhesion hydroxyapatite to titanium alloy limits its clinical positive outcome.

The aim of this study was production a thin HA coating on composite layer $Ti_3P+Ti-Ni$ type, for improvement titanium alloy implant ingrowth with bone.

Materials and methods

The composite surface layers $Ti_3P+Ti-Ni$ type on $Ti6Al4V$ titanium alloy were produced. The method of chemical electrodeless nickel-phosphorous deposition combined with glow discharge enhanced heat treatment were used [1-3]. Hydroxyapatite coatings were produced by Pulsed Laser Deposition (PLD) method by applying of titanium wire-netting with diameter $\Phi \sim 1$ mm. On the outer zone Ti_3P hydroxyapatite was applied. Morphology and topography of HA composite layer were analysed respectively in scanning electron microscopy (Hitachi s-350), atomic force microscopy (AFM Digital Instruments Multi Mode). The biocompatibility of this surface was examined with the Saos-2 osteoblast-like cells human osteosarcoma cell line, ATCC collection. The 48-hour cell incubations on samples were conducted according to the method described in our previous studies [4,5]. Cell biological activity, adhesion and distribution on the surface, as well as fibronectin production and expression of fibronectin receptor were investigated. Confocal microscopy (Olympus FV-500 System) was applied in this study. Expression of analysed protein was measured by Cell P a morphometric program (Olympus).



RYS.1. Morfologia (A) i topografia (C) powierzchni warstwy $Ti_3P+Ti-Ni$ wytworzonej na stopie tytanu $Ti-6Al-4V$. Wyspy hydroksyapatytu wytworzone na warstwie $Ti_3P+Ti-Ni$ (B). Morfologia (D) i topografia (E) powłoki hydroksyapatytu wytworzonej na warstwie $Ti_3P+Ti-Ni$.

FIG.1. Morphology (A) and topography (C) surface layers $Ti_3P+Ti-Ni$ type produced on titanium alloy $Ti-6Al-4V$. Islands of HA coating produced on layer $Ti_3P+Ti-Ni$ (B). Morphology (D) and topography (E) HA coating produced on layer $Ti_3P+Ti-Ni$.

Wyniki

Charakterystyka powierzchni

Wytworzona na stopie tytanu warstwa kompozytowa typu $Ti_3P+Ti-Ni$ poprawiała właściwości mechaniczne warstwy wierzchniej próbek i jej mikrotwardość wynosi ok. 1200 HV0.05, a stopu $Ti6Al4V$ 500 HV0.05. Hydroksyapatyt (HA) naniesiony metodą PLD na warstwie kompozytowej tworzył wyspy o średnicy ok. 1mm i grubości ok. 1-3 μm . Morfologię powierzchni i topografię warstw kompozytowych przedstawiono na RYS.1.

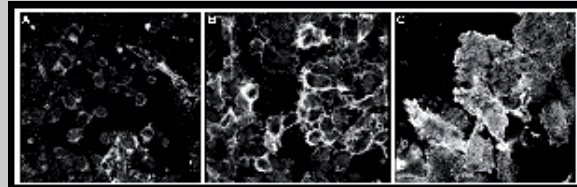
Badania biologiczne

Osteoblasty linii Saos-2 hodowane na badanych powierzchniach dobrze na nich adherowały chociaż szybciej do próbek Ti_3P . Komórki rosnące na HA lokowały się głównie w szczelinach i zagłębieniach. Syntetyzowały one i wydzielaly białko wchodzące w skład macierzy pozakomórkowej – fibronektynę, która na powierzchni biomateriału tworzyła biofilm o ziarnistej strukturze (RYS.2A). Formę włóknkową fibronektyny obserwowano sporadycznie. Receptory $\alpha 5\beta 1$ (tj. receptory dla fibronektyny) były głównie rozmieszczone na obwodzie komórek zarówno rosnących na próbkach z warstwą HA jak i na Ti_3P (RYS.2 B, C). Osteoblasty osiedlone na warstwie HA miały kształt okrągły i tworzyły długie nitkowe wypustki, podczas gdy komórki rosnące na Ti_3P były wydłużone i tworzyły krótkie, palczaste wypustki (RYS.2).

Podsumowanie

Osteoblasty linii Saos-2 szybciej adherowały na warstwie Ti_3P niż na HA. Z wcześniejszych badań wynika, że hodowane komórki na Ti_3P cechuje wysoka aktywność cyklu komórkowego [6]. Być może inny kształt komórek zaadherowanych na Ti_3P świadczy o ich zróżnicowanej aktywności biologicznej. Meredith [7] w swoich badaniach zaobserwował, że komórki znajdują się w innych fazach cyklu komórkowego niż faza S mają kształt okrągły.

Nie wiadomo czy ta aktywność była związana z właściwościami wytworzonego HA, tj. stopniem krystalizacji i mikrostruktury. Fakt, że komórki chętniej zakotwiczyły się w szczelinach HA może wskazywać, że jego topografia może wpływać korzystnie na wytworzenie dobrego kontaktu komórka – powierzchnia biomateriału.



RYS.2. Rozmieszczenie fibronektyny na powierzchni próbek z hydroksyapatytem wytworzonym na warstwie Ti_3P (A) oraz receptora $\alpha 5\beta 1$ w błonie komórkowej osteoblastów zadherowanych na hydroksyapatycie (B) i na powierzchni Ti_3P (C) wytworzonego na stopie tytanu $Ti6Al4V$ analizowane w mikroskopie konfokalnym. Powiększenie mikroskopowe 60x.

FIG.2. Distribution of fibronectin on hydroxyapatite coating produced on the Ti_3P layer (A). Receptor $\alpha 5\beta 1$ for fibronectin adhered on HA (B) and on surface layer Ti_3P (C) produced on titanium alloy $Ti6Al4V$ analysed by confocal microscopy. Microscopy magnification 60x.

Results

Surface characteristics

A composite surface layer of the $Ti_3P+(Ti-Ni)$ type on titanium alloy $Ti6Al4V$ was produced. This new layer presented better mechanical properties, than reference titanium alloy and microhardness was respectively 1200 HV0.05 and 500 HV0.05. HA layer formed on Ti_3P "islands" with diameter ~ 1mm and high ~ 1-3 μm . Morphology and topography of the composite surface layer and HA are presented on the FIG.1.

Biocompatibility

The osteoblast cell line Saos-2 well adhered to the both investigated surfaces, however it higher extend on Ti_3P surface layer at the time. Cells cultured on HA layer were settled mainly in fissures of HA. They synthesised and released fibronectin, which formed a granular biofilm on the material surface (FIG.2A). Fibrillar form of fibronectin was sporadic. Fibronectin receptors ($\alpha 5\beta 1$) were localised mainly at the furthest points of the cell periphery on HA coating as well as Ti_3P (FIG.2 B, C).

Osteoblasts adhered on the HA coating were round shaped and formed long, thread-like protrusions, while cells on Ti_3P layer were elongated or triangle shaped with short, finger-like protrusions.

Summary

Osteoblast line cells Saos-2 cultured on biomaterials adhered faster on the Ti_3P layer than on the HA coating. Our previous study showed that cells cultured on Ti_3P were characterized by high activity of cell cycle [6]. It can not be excluded the differences in cell shapes when osteoblasts were adhered on Ti_3P and HA are related to their various biological activity. Meredith et al. [7] observed that cell shape was dependent on cell cycle phase.

It is not known if the cell activity was determined by properties of HA i.e. cristalization and microstructure. The evidence that cells anchored mainly in HA fissure may suggest that HA layer expresses adequate topography leading to acquisition of a proper contact between cell and biomaterial surface.

Further studies will allow for better understanding of mechanisms leading to cell adhesion on HA layer.

Badania były finansowane z projektu: 1138-T08-2005-29.

Piśmiennictwo

- [1] T. Wierzchoń, E. Sikorska. Zgłoszenie patentowe nr P351 835 z dn. 23.01.2002.
 [2] T. Wierzchoń, E. Czarnowska i wsp. Proc 15 th Symp on Plasma Chemistry, Orleans, France. 2001; 5:625.
 [3] E. Sikorska-Matysiak, E. Czarnowska, T. Wierzchoń. Inżynieria Biomateriałów 2002; 23-25: 17.

WPŁYW MODYFIKACJI BIAŁKOWEJ NA WŁAŚCIWOŚCI HYDROKSYAPATYTU JAKO NOŚNIKA GENTAMYCYN

JUSTYNA ZALEWSKA*, GRAŻYNA GINALSKA*, ANNA ŚLÓSARCZYK**, PIOTR GODLEWSKI***

*KATEDRA I ZAKŁAD BIOCHEMII, AKADEMIA MEDYCZNA, 20-093 LUBLIN, UL. CHODZKI 1, POLSKA

**KATEDRA TECHNOLOGII I CERAMIKI AGH, AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW, POLSKA

***KATEDRA I KLINIKA ORTOPEDII I TRAUMATOLOGII, AKADEMIA MEDYCZNA, 20-094 LUBLIN, UL. JACZEWSKIEGO 8, POLSKA

[Inżynieria Biomateriałów, 58-60,(2006),214-216]

Wprowadzenie

Hydroksyapatyty złożone z fosforanów wapnia będących naturalnym składnikiem konstrukcyjnym kości, są obecnie jednym z lepszych materiałów implantacyjnych w ortopedii i stomatologii. Są one biokompatybilne i po wszczepieniu nie wywołują znaczącej odpowiedzi immunologicznej [1]. Ze względu na specyfikę zabiegów implantacyjnych, częstość występowania zakażeń miejscowych jest bardzo niska i oscyluje w granicach 1-3%, jednak w obrębie tych przypadków, ryzyko utraty kończyny lub śmierci pacjenta jest bardzo wysokie. Głównymi czynnikami etiologicznymi zakażeń są *S. aureus* i *S. epidermidis*. Skutecznym sposobem profilaktyki zakażeń implantu jest stosowanie antybiotykoterapii ogólnej, jednakże mniej szkodliwa dla pacjenta jest ochrona miejscowa wszczepionego materiału. Pozwala ona na zmniejszenie dawki leku dostarczonej do organizmu [2]. Hydroksyapatyt dzięki porowatej strukturze może być potencjalnym nośnikiem leków [3;4] i uwalniając lek *in situ* może zapobiec infekcjom pooperacyjnym i tworzeniu biofilmu na powierzchni implantu [5].

Celem prezentowanej pracy była modyfikacja materiału hydroksyapatytowego białkami a następnie immobilizacja chemiczna gentamycyny w kierunku wytworzenia biomateriału zdolnego do stopniowego uwalniania leku do otaczającego środowiska.

Metodyka

Granulat hydroksyapatytowy wykonano w Katedrze Technologii i Ceramiki AGH w Krakowie. Parametry HAP

Acknowledgements

This study was financed by project: 1138/T08/2005/29.

References

- [4] T. Wierzchoń. Materials Science Forum 2003; 426: 232.
 [5] E. Czarnowska, A. Sowinska, B. Cukrowska i wsp. Ann. Transplant. 2004; 9: 72.
 [6] E. Czarnowska, A. Zajączkowska, A. Sowińska. CIMTEK 2006:173.
 [7] D.O. Meredith et al. Experimental Cell Research. 2004; 293: 58.

THE INFLUENCE OF PROTEIN MODIFICATION ON HYDROKSYAPATITE PROPERTIES AS GENTAMICIN CARRIER

JUSTYNA ZALEWSKA*, GRAŻYNA GINALSKA*, ANNA ŚLÓSARCZYK**, PIOTR GODLEWSKI***

*CHAIR AND DEPARTMENT BIOCHEMISTRY, MEDICAL UNIVERSITY OF LUBLIN, 1 CHODZKI STR., 20-930 LUBLIN, POLAND

**FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS, AGH-UST, 30 MICKIEWICZA STR., 30-059 CRACOW, POLAND

***DEPARTMENT OF ORTHOPEDICS AND TRAUMATOLOGY, MEDICAL UNIVERSITY OF LUBLIN, 8 JACZEWSKIEGO STR., 20-954 LUBLIN, POLAND

[Engineering of Biomaterials, 58-60,(2006),214-216]

Introduction

Hydroxyapatite ceramics based on calcium phosphates, chemical compounds being natural constructive element of bones is now regarded to be one of better implantation materials in orthopedic surgery and stomatology (1) because it is an unusually biocompatible material and it does not evoke a significant host response. Due to specifics of implantation procedures frequency of local infections is very low, achieving 1-3%. However, among these cases, the risk of limb amputation or patient's death is very high. The main etiological factors of infections are *S. epidermidis* and *S. aureus*. An efficient way of implant infections prophylaxis is systemic antibiotic therapy (2); however, local drug delivery is less harmful for organism because it allows for reduction of drug dose. So, porous structure of hydroxyapatite has recently been considered as a potential material for drug delivery system (3,4). This type of drug delivery system can release a therapeutic agent *in situ* to avoid infections after surgical procedures and formation of biofilm on implant surface (5)

The aim of the present study was modification of hydroxyapatite material by proteins and next chemical gentamicin immobilization to construct a biomaterial with ability to release the drug gradually to surrounding environment.

Methods

Hydroxyapatite was made in Chair of Technology and Ceramics, AGH, Kraków. Hydroxyapatite parameters