

siedlenia przez komórki, a także porów o rozmiarach ok. 1 mm, odpowiednich do odprowadzanie produktów degradacji polilaktydu. Opisaną metodą uzyskano całkowitą porowatość przekraczającą 80%. Testy przydatności takich podłoży do hodowli osteoblastów in vitro są w toku.

Podziękowania

Praca była finansowana ze środków KBN, grant 05/PBZ-KBN-082/2002/06.

Piśmiennictwo

- [1] I. Grizzi, H. Garreau, S. Li, M. Vert, *Biomaterials*, 16, 305-311 (1995).
 [2] A. Kowalski, A. Duda, S. Penczek, *Macromolecules*, 31, 2114-2122 (1998).
 [3] A. Duda, S. Penczek Mechanism of aliphatic polyester formation

WPŁYW TiN NA TWORZENIE BIOFILMU I AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNĄ KOMÓREK W WARUNKACH IN VITRO

SOWIŃSKA A.*, ZAJĄCZKOWSKA A.*, CUKROWSKA B.*,
WIERZCHOŃ T.***, SOBIECKI R.**, 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

[*Inżynieria Biomateriałów*, 38-43, (2004), 120-123]

Wstęp

Struktura i właściwości warstw azotowanych na stopach tytanu zależą od zastosowanej metody i jej parametrów wytwarzania. Warstwy azotowane typu $TiN+Ti_2N+aTi(N)$ uzyskane w warunkach wyładowania jarzeniowego poprawiają odporność na zużycie i korozję stopów tytanu oraz wykazują dobrą biozgodność, co zostało stwierdzone w naszych badaniach [1, 2]. Wydaje się, że warstwy azotowane jarzeniowo wytworzone na implantach tytanowych, biozgodne z kością, pozwoliłyby na długotrwałe przebywanie tych implantów w organizmie. Celem obecnie przeprowadzanych badań była ocena biozgodności TiN z ludzkimi fibroblastami w warunkach in vitro pod kątem rozmieszczenia biofilmu i adhezji komórkowej do próbek oraz aktywności biologicznej zaadherowanych komórek.

Materiały i metody

Wytwarzanie warstwy azotowanej

Próbki ze stopu tytanu Ti6Al4V zostały poddane proce-

ence of big pores appropriate for settlement of cultured cells and small pores across walls facilitating removal of products of degradation of polymeric material from walls. Proposed procedure allowed preparation of scaffolds with total porosity above 80%. In vitro tests of culturing osteoblast cells on these scaffolds are in progress.

Acknowledgements

This work was supported by the State Committee of Scientific Research, grant No. 05/PBZ-KBN-082/2002/06.

References

- in *Biopolymers*, Vol 3b: Polyesters II - Properties and Chemical Synthesis, ed. A. Steinbüchel, Y. Doi, Wiley-VCH, Weinheim 2002, chapter 12, pp 371-430.
 [4] M. Gadzinowski, S. Sosnowski, *J. Polym. Sci, Part A*, 41, 3750-3760 (2003).

THE EFFECT OF TiN ON FORMED BIOFILM AND CELL BEHAVIOR IN VITRO

SOWIŃSKA A.*, ZAJĄCZKOWSKA A.*, CUKROWSKA B.*,
WIERZCHOŃ T.***, SOBIECKI R.**, CZARNOWSKA E.*

*PATHOLOGY DEPT.,
THE CHILDREN'S MEMORIAL HEALTH INSTITUTE,
04- 730 WARSAW, AL. DZIECI POLSKICH 20,
**FACULTY OF MATERIALS SCIENCES AND ENGINEERING,
WARSAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,
02-507 WARSAW, WOŁOSKA 141

[*Engineering of Biomaterials*, 38-43, (2004), 120-123]

Introduction

The method of producing nitrided surface layer, along with the process parameters used have a marked effect on surface properties and characteristic. Nitrided surface layers produced under glow discharge conditions improved wear and corrosion resistance of titanium alloys and exhibit good biocompatibility as have been shown in our studies [1, 2]. This layer might be a candidate for application in long term bone implants. In this study to create a requirement for these applications, we investigated the biocompatibility of TiN using human fibroblasts in term of biofilm morphology, cell arrangement and physiological behavior.

Materials and methods

Nitrided surface layer preparation

Specimens of the Ti6Al4V alloy were subjected to a nitriding process under glow discharge conditions at a temperature of 850°C in an atmosphere of nitrogen and under 4 hPa pressure. Samples were cleaned with ethanol and distilled water and sterilised for one cycle in a plasma - Sterrad 100 apparatus in an atmosphere of H_2O_2 at 54°C for 1 h.

Surface layer characteristics

The surface layers were examined as regards their:

sowi azotowania 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, w aparacie Sterrad 100, w atmosferze H₂O₂, w 54°C, przez 1 godzinę.

Charakterystyka warstwy powierzchniowej

Wytworzone warstwy były poddane badaniom metalograficznym w mikroskopie optycznym Neophot 2. Zgład metalograficzny był trawiony odczynnikami o składzie: 96 cm³ H₂O + 2 cm³ HNO₃ + 2 cm³ HF. Topografię warstw badano w mikroskopie skaningowym Hitachi S-3500N, a chropowatość na profilometrze skanującym Form Talysurf Series 2 firmy Taylor Hobson. Skład fazy określano na dyfrakto-metrze rentgenowskim Philips PW1830 stosując promieniowanie CoKa. Morfologię powierzchni analizowano w mikroskopie elektronowym skaningowym JSM 35C.

Charakterystyka komórek

Fibroblasty z ludzkiej skóry inkubowano na próbkach biomateriałów przez 48 godzin według wcześniej opisanej procedury [3]. W badanych hodowlach komórkowych oceniano żywotność komórek, zdolność proliferacyjną, występowanie apoptozy, ekspresję receptora fibronektyny i rozmieszczenie fibronektyny w wytworzonym biofilmie. W badaniach zastosowano laserowy cytometr skaningowy (LSC, CompuCyte, Boston, MA) i mikroskop konfokalny (FV-500 system; Olympus, Hamburg, Germany).

Wyniki i dyskusja

Wytworzona powierzchniowa warstwa azotowana typu TiN+Ti₂N+aTi(N) charakteryzowała się grubością około 50 nm, w której zewnętrzna strefa TiN miała grubość około 4 nm (Rys. 1a). Twardość wytworzonej warstwy wynosiła 1900 HV_{0,05}, a jej odporność na korozję była porównywalna z wysoką odpornością stopu tytanu [2]. Morfologię i topografię powierzchni próbek po sterylizacji plazmowej przedstawiono na Rys. 1b, c. Parametry chropowatości były następujące: Ra (średnia arytmetyczna odchylenia profilu chropowatości) - 0,426 μm, Rv (maksymalna głębokość wgłębienia profilu chropowatości) - 2,56 μm, Rp (maksymalna wysokość wzniesienia profilu chropowatości) - 3,86 μm, Rt (maksymalna wysokość chropowatości; Rt=Rp+Rv) - 6,42 μm.

Białkowy biofilm wytworzony na powierzchni TiN i stopie tytanu w warunkach hodowli fibroblastów charakteryzowała obecność delikatnej, włókninowej sieci fibronektyny, białka odgrywającego istotną rolę w adhezji komórkowej (RYS. 2a, b). Badania metodą LSC wykazały, że ilość fibronektyny wytworzonej na TiN była mniejsza niż na stopie tytanu. Komórki, które zaadherowały na powierzchni próbek ze stopu tytanu i na warstwie azotowanej charakteryzowała podobna ekspresja receptora fibronektyny. Analiza cyklu ko-

- microstructure by etching of the metallographic microsection of the surface layers in a solution of chemical composition: 96cm³ H₂O + 2 cm³ HNO₃ + 2cm³ HF, using a Neophot 2 microscope;
- Vickers microhardness using a Neophot microscope equipped with a Hanemann unit;
- phase composition using Philips PW 1830 x-ray diffractometer with CoKa radiation source;
- surface topography in a Taylor Hobson scanning profilometer Form Talysurf series 2, and scanning microscopy Hitachi S-3500N type.

Cell behaviour

Human skin fibroblasts were cultured for 48 hours on samples according to previously described methods [3]. Cell cultures were analysed in terms of cell viability, apoptosis, adhesion, fibronectin production and biofilm morphology. These were examined by laser scanning cytometry (LSC, CompuCyte, Boston, MA) and confocal microscopy (FV-500 system; Olympus, Hamburg, Germany).

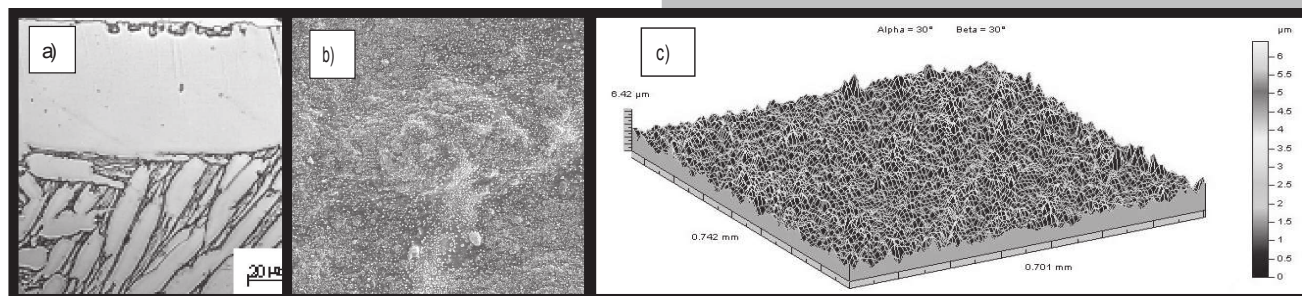
Results and discussion

The produced nitrided surface layer was of the TiN+Ti₂N+aTi(N) type of 50 nm thickness with a TiN about 4 nm (FIG. 1a) and hardness of 1900 HV_{0.05}. The corrosion resistance of this layer was similar to titanium alloy [2]. The morphology and layer topography after samples sterilization is shown in FIG.1b,c. The roughness parameters were: Ra (arithmetic mean deviation) - 0.426 μm, Rv (maximal depth of the peak) - 2.56 μm, Rp (maximal height of the peak) - 3.86 μm, Rt (maximum height of the roughness: Rt=Rp+Rv) - 6.42 μm.

Human fibroblasts cultured on TiN and titanium alloy substrate exhibited a fine fibre network with abundant fibronectin, a protein playing role in cell adhesion (FIG. 2a, b). Investigations by LSC revealed lower number of fibronectin on TiN substrate than on titanium alloy.

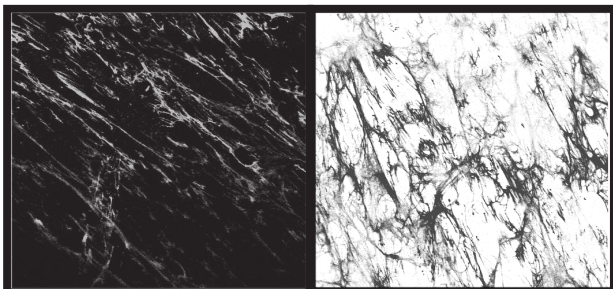
Cells adhered to the substrate exhibited similar expression of fibronectin receptor on the membrane of cells growing on TiN and on titanium alloy (not shown). Analysis of the cell growth shown that among the cell growing on TiN the highest number of cells was in G1 phase while about 3% cells were apoptotic (FIG. 3). Apoptosis was higher in cell population cultured on titanium alloy in comparison to TiN. Immunohistochemical investigations with antibody anti-Ki67 of fibroblasts cultured on samples confirmed their high proliferation potential.

From the literature it is well known that surface layer properties as microstructure, roughness and chemical composition are crucial for bone implants biocompatibility [4,5]. Our earlier study demonstrated that nitrided surface layer can be produced on parts with sophisticated shapes and



RYS. 1. Mikrostruktura, morfologia i topografia powierzchni warstwy wytworzonej w warunkach wyładowania jarzeniowego w 850°C i sterylizowanej plazmowo (Sterrad 100).

FIG. 1. Microstructure, morphology and topography of the nitrided surface layer produced under glow discharge conditions at 850°C and sterylized in plasma (Sterrad 100).



RYS. 2. Rozmieszczenie fibronektyny w biofilmie wytworzonym przez ludzkie fibroblasty na próbkach z powierzchniową warstwą azotowaną wytworzoną w warunkach wyładowania jarzeniowego (a) i na stopie tytanu Ti6Al4V (b) sterylizowanych plazmowo.

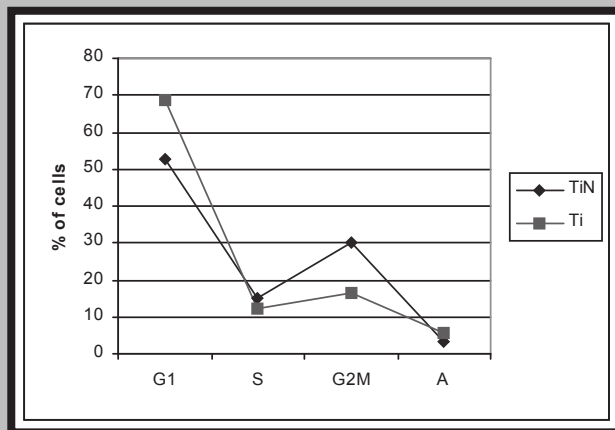
FIG. 2. Fibronectin network in biofilm produced by human fibroblast on samples with nitrided surface layer produced under glow discharge conditions (a) and on Ti6Al4V (b) and then sterilized in plasma.

mórkowego fibroblastów wykazała, że w populacjach rosnących na TiN najwięcej komórek było w fazie G1, a tylko około 3% stanowiły komórki apoptotyczne (RYS. 3). Większą apoptozę obserwowano w hodowlach na stopie tytanu niż na TiN. Badania immunohistochemiczne z zastosowaniem przeciwciała anti-Ki67 fibroblastów hodowanych na badanych materiałach potwierdziły ich wysoki potencjał proliferacyjny.

Dane literaturowe wskazują, że właściwości warstwy powierzchniowej wytworzonej na biomateriale takie, jak mikrostruktura, chropowatość i skład chemiczny mają podstawowy wpływ na biogodność implantów kostnych [4,5]. Nasze wcześniejsze badania wykazały, że powierzchniowa warstwa azotowana może być wytwarzana na implantach o skomplikowanych kształtach i zabezpiecza je przed uwalnianiem składników stopu tytanu do środowiska biologicznego [2]. Hodowle komórkowe, m.in. fibroblastów i osteoblastów są powszechnie stosowanym modelem w badaniach biogodności materiałów przeznaczonych na implanty, a wyniki badań TiN w warunkach in vitro potwierdziły dobrą biogodność tej warstwy [1, 6]. Obecnie badane wykładniki aktywności biologicznej komórek, jak: żywotność komórkowa, apoptoza, adhezja i wytwarzanie biofilmu sugerują, że implanty tytanowe azotowane w warunkach wyładowania jarzeniowego mogą wykazywać lepszą integrację z ludzkimi tkankami niż implanty tytanowe. Badania kliniczne implantów kostnych z wytworzoną warstwą TiN są nieliczne i dotyczą przede wszystkim warstw otrzymanych metodą PVD, które w czasie przebywania w organizmie ulegają uszkodzeniu [7, 8]. Tylko badania implantów kostnych z warstwą TiN wytworzoną metodą PIRAC, przeprowadzone przez Sovaka i wsp. (2000) wykazały ich bardzo dobrą osteointegrację, porównywalną ze stopem tytanu [9]. Należy zaznaczyć, że warstwa azotowana typu TiN+Ti₂N+aTi(N) wytworzona w warunkach wyładowania jarzeniowego, badana w naszych doświadczeniach z ludzkimi komórkami ma charakter dyfuzyjny o kontrolowanej mikrostrukturze, topografii powierzchni, składzie chemicznym i fazowym.

Podziękowania

Praca finansowana jest przez Komitet Badań Naukowych - projekty badawcze nr:08/PBZ-KBN082/T08/2002, Eureka 2841 oraz 7T08D03621.



RYS. 3. Fazy cyklu komórkowego populacji ludzkich fibroblastów hodowanych 48 godzin na próbkach z zewnętrzną warstwą TiN i na stopie Ti6Al4V sterylizowanych plazmowo (Sterrad 100). (G1,S,G2M - fazy cyklu komórkowego, A- apoptoza).

FIG. 3. Phase of growth of human fibroblasts population cultured 48h on samples with TiN outer layer and Ti6Al4V alloy sterilized in plasma (Sterrad 100). (G1,S,G2M-phase of cell growth, A-apoptosis).

protect against ion release from titanium alloy [2].

Cultures of fibroblasts and osteoblasts are widely used as a model to study biocompatibility of material for bone implant and in vitro TiN investigations confirmed good biocompatibility of this surface layer [1, 6]. Recent analysis of cell viability, apoptosis, adhesion and distribution of biofilm were promising in term of better in-growth of implant in human tissue in comparison to titanium alloy. Clinical experience with TiN-coated bone implants are limited and concern of surface layers produced in PVD method, and they have been shown the layer delamination in time of use [7, 8]. While study of TiN produced in bone implant by PIRAC method revealed its good osseointegration, similar to titanium alloy [9]. Should be pointed that nitrided surface layer produced under glow discharge conditions, tested in our study is a diffusion layer, with controlled microstructure, topography, chemical and phase composition.

Acknowledgements

This study was supported by Polish Scientific Committee (KBN) within project 08/PBZ-KBN082/T08/2002, Eureka 2841 and 7T08D03621.

Piśmiennictwo

References

- [1] Czarnowska E., Wierchoń T., Maranda-Niedbała A., Mat. Proc. Tech., 92-93 (1999), 190-194.
- [2] Czarnowska E., Wierchoń T., Maranda-Niedbała A., i in., J. Mat. Sci. Mat. Med. 11 (2000), 73-81.
- [3] Czarnowska E., Sowińska A., Cukrowska B., Godlewski M., Wierchoń T., Ann. Transp., w druku.
- [4] Hanawa T., Mat. Sci. Eng. A267 (1999), 260-66.
- [5] Cooper L.F., J. Prosthet. Dent. 84 (2000), 522-34.
- [6] Cyster L.A., Parker K.G., Parker T.L., Grant D.M., Biomaterials 25 (2004), 97-107.
- [7] Haman M.K., Banks S.A., Hodge W.A., J. Arthroplasty 12 (1997), 938-45.
- [8] Massound S.N., Hunter J.B., Holdsworth B.J., i in., J. Bone Joint Surg. [Br] 79-B (1997), 603-608.
- [9] Sovak G., Weiss A., Gotman I., J. Bone Joint Surg. [Br] 82-B (2000), 290-296.