

BIOZGODNOŚĆ W WARUNKACH IN VITRO DYFUZYJNEJ WARSTWY TYPU Ti_3P WYTWORZO- NEJ NA STOPIE TYTANU

ZAJĄCZKOWSKA A.*, SOWIŃSKA A.*, SIKORSKA E.**,
CUKROWSKA B.*, 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,

[*Inżynieria Biomateriałów, 38-43, (2004), 139-141*]

Wstęp

Dążenie do optymalizacji właściwości stopów tytanu stosowanych na implanty kostne jest przyczyną poszukiwania nowych metod inżynierii powierzchni. Z naszych wstępnych badań wynika, że warstwa typu $Ti_3P+(Ti,Ni)$ wytworzona na stopach tytanu poprawia odporność materiału na zużycie zachowując dobrą odporność korozyjną stopu tytanu [1]. Badanie tego typu warstwy nie mają odniesienia w literaturze. Biomateriały kontaktujące się z komórkami i tkankami aktywują procesy biologiczne, które są odpowiedzialne za biogodność implantu. Szczególnie ważne dla oceny biogodności warstw powierzchniowych są badania pozwalające ocenić wpływ topografii i składu chemicznego powierzchni na wytworzenie białek adhezyjnych, adhezję i proliferację komórek.

Celem badań była ocena właściwości biologicznych kompozytowej warstwy powierzchniowej typu $Ti_3P+(Ti,Ni)$ wytworzonej na stopie tytanu w aspekcie zastosowania jej na implanty kostne.

Materiały i metody

Przygotowanie próbek

Warstwę typu $Ti_3P+(Ti,Ni)$ wytworzono na stopie tytanu Ti-6Al-4V poprzez autokatalityczne nanoszenie warstwy niklowo-fosforowej w roztworze zawierającym fosforan (I) sodu ($NaH_2PO_2 \cdot xH_2O$), chlorek niklu ($NiCl_2 \cdot 6H_2O$) oraz octan sodu ($CH_3COONa \cdot 2H_2O$) w temperaturze 95°C przez 1 godzinę. Tak przygotowane próbki poddano następnie obróbce jarzeniowej w atmosferze argonu, w temperaturze 700°C przez 4 godziny. Próbki płukano etanolem i wodą destylowaną, a następnie sterylizowano plazmowo w aparacie Sterrad 100 w atmosferze H_2O_2 w temperaturze 54°C i ciśnieniu 7 hPa przez 1 godzinę.

Charakterystyka warstwy

Wytworzone warstwy były poddane badaniom: metalograficznym na mikroskopie Neophot 2, topografii powierzchni na mikroskopie skaningowym Hitachi S-3500N, chropowatości powierzchni na profilometrze skanującym Form Talysurf Series 2 firmy Taylor Hobson, składu fazowego na dyfraktometrze rentgenowskim Philips PW 1830 stosując promieniowanie CoK_{α} .

BIOCOMPATIBILITY OF DIFFUSION Ti_3P LAYER PRODUCED ON TITANIUM ALLOY SURFACE IN IN VITRO STUDY

139

ZAJĄCZKOWSKA A.*, SOWIŃSKA A.*, SIKORSKA E.**,
CUKROWSKA B.*, WIERZCHOŃ T.***, 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), 139-141*]

Introduction

Looking for a new surface layer that improve titanium alloy properties for bone implants are still in progress. Composite layers $Ti_3P+(Ti,Ni)$ type produced on titanium alloys endow materials with new features. In our preliminary studies it was shown that this surface layer improves wear resistance simultaneously preserving high corrosion resistance of titanium alloy [1]. These surface layers have not been studied by other scientists, yet. Biomaterials activate different biological processes in the contact with cells and tissues, which are responsible for implant biocompatibility, therefore production of a new surface layer requires studies in this term. It is particularly important for biocompatibility to study the effect of surface topography and chemical composition on synthesis of adhesive proteins and cell behaviour. Our study was aimed to estimate the biological features of $Ti_3P+(Ti,Ni)$ surface layer produced on titanium alloy in term of application in bone surgery.

Materials and methods

Samples preparation

Specimens of the Ti-6Al-4V alloy were subjected to nickel electroless chemical deposition in a water solution containing $NiCl_2$, NaH_2PO_2 and CH_3COONa at temperature of 95°C for 1 hour, followed by thermal treatment under glow discharge conditions in an atmosphere of argon at temperature 700°C for 4 hours. Samples were cleaned with ethanol and sterilised in plasma - Sterrad 100 apparatus in an atmosphere of H_2O_2 at 54°C and 7 hPa for 1h.

Surface layer characteristics

The surface layers were examined as regards their:

- microstructure by etching of the metallographic microsection of the surface layers in a solution of chemical composition: $96 \text{ cm}^3 H_2O + 2 \text{ cm}^3 HNO_3 + 2 \text{ cm}^3 HF$, using a Neophot 2 microscope;
- phase composition using Philips PW 1830 x-ray diffractometer with CoK_{α} radiaton source;
- surface topography in a Taylor Hobson scanning profilometer Form Talysurf Series 2, and scanning microscopy Hitachi S-3500N type.

Cell behaviour

Osteoblast-like human osteosarcoma cells Saos-2 (the

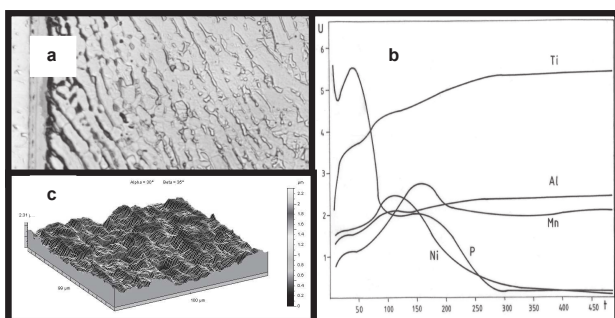
Aktywność biologiczna komórek

Osteoblasty (linia komórkowa Saos-2, American Type Culture Collection) hodowano przez 48 godzin na próbkach według opisanej metody [2]. Hodowlę komórkową analizowano badając żywotność i apoptozę komórek, cykl komórkowy oraz produkcję fibronektyny i ekspresję receptora fibronektyny ($\alpha 5\beta 1$) za pomocą skaningowej cytometrii laserowej (LSC, CompuCyte, USA) i mikroskopu konfokalnego (Olympus, FV-500 System, Niemcy).

Wyniki

Charakterystyka powierzchni

Na stopie tytanu wytworzono kompozytowej warstwy powierzchniowej typu $Ti_3P+(Ti,Ni)$. Warstwa zewnętrzna - Ti_3P o grubości około 4 μm znacznie poprawiła odporność na zużycie przez tarcie stopu tytanu oraz wyeliminowała zjawisko uwalniania składników stopu tytanu do środowiska. Mikrostrukturę i topografię oraz rozkład pierwiastków w warstwie kompozytowej przedstawiono na RYS.1.

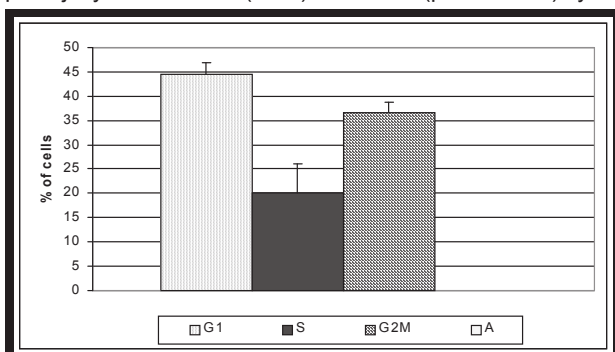


RYS. 1. Mikrostruktura (a), rozkład pierwiastków Ti, Al, Mn, Ni, i P (b) i topografia (c) warstwy powierzchniowej typu $Ti_3P+(Ti,Ni)$ na stopie tytanu Ti-6Al-4V.

FIG. 1. Microstructure (a), distribution of Ti, Al, Mn, Ni i P (b) and topography (c) of the $Ti_3P+(Ti,Ni)$ type surface layer produced on Ti-6Al-4V alloy.

Biozgodność

Osteoblasty hodowane na $Ti_3P+(Ti,Ni)$ analizowane w mikroskopie konfokalnym były równomiernie rozłożone na całej powierzchni biomateriału. Najwięcej komórek w populacji było w fazie G1 (45%) oraz G2M (ponad 35%) cyklu



RYS. 2. Wzrost osteoblastów na warstwie Ti_3P wytworzonej na stopie tytanu Ti6Al4V analizowany w mikroskopie konfokalnym. G1,S,G2M-fazy cyklu komórkowego, A-apoptopza.

FIG. 2. Growth of osteoblast-like cells on samples with composite Ti_3P surface layer analysed under confocal microscopy. G1,S,G2M-stages of cell growth, A-apoptosis.

American Type Culture Collection) were cultured for 48 hours on samples according to previously described methods [2]. Cell cultures were analysed in terms of cell viability, apoptosis, cell cycle, fibronectin production and expression of fibronectin receptor using laser scanning cytometry (LSC, CompuCyte, USA) and confocal microscopy (Olympus FV-500 System, Germany).

Results

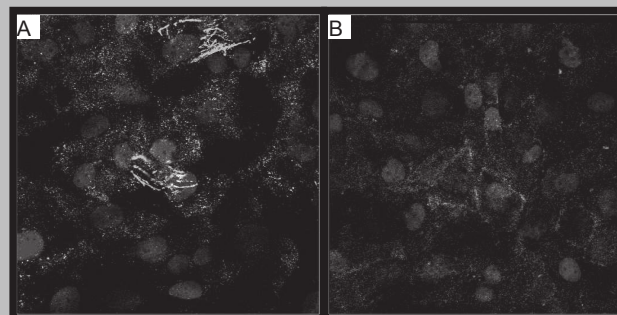
Surface characteristics

The composite surface layer of the Ti_3P+Ti,Ni type was produced on titanium alloy. The thickness of Ti_3P , the outer layer, was about 4 μm . The produced surface layer exhibited high wear resistance and good corrosion resistance compatible to Ti-6Al-4V alloy and protected against release of ions from the titanium alloy. The microstructure and topography of composite layer was shown at FIG. 1.

Biocompatibility

Cells cultured on Ti_3P surface and visualised under confocal microscopy were regularly distributed over the surface. The most of cells were in G1 (45%) and G2M (over 35%) stage of the cell cycle (FIG. 2).

There were no apoptotic cells in examined population. The matrix of intact cellular fibronectin was composed mostly of uniform non-fibrillar network, and only in some areas fibronectin formed fibrillar aggregates (Fig. 3A). Fibronectin receptors ($\alpha 5\beta 1$) expression presented diffuse pattern in most cells, only in aggregated cells this receptor was strongly distributed on the cell membrane (FIG. 3B).



RYS. 3. Rozmieszczenie fibronektyny (A) i jej receptora $\alpha 5\beta 1$ (B) w hodowli osteoblastów linii Saos-2 na warstwie Ti_3P wytworzonej na stopie tytanu Ti-6Al-4V analizowane w mikroskopie konfokalnym.

FIG. 3. Fibronectin (A) and its receptor $\alpha 5\beta 1$ (B) in population of osteoblast-like cells cultured on Ti_3P surface layer and analysed in confocal microscopy.

Discussion

Our results showed that osteoblasts (Saos-2 cells) adhered to the composite surface layer $Ti_3P+(Ti,Ni)$ type produced on titanium alloy and demonstrated high biological activity. Fibronectin, the element of biofilm produced on biomaterial aggregated in some areas of the surface. It can not be excluded that these areas have a specific topography and/or chemical composition which activate osteoblasts to produce fibronectin. High expression of fibronectin receptor in cell membrane mainly in some cells is followed by aggregated fibronectin in biofilm. Surface topography analyses revealed lower roughness of some areas, what

komórkowego. W badanej populacji nie znaleziono komórek martwych (RYS. 2).

Fibronektyna zlokalizowana zewnątrzkomórkowo tworzyła jednolitą sieć. Skupiska włókienek obserwowano sporadycznie (RYS. 3A). Ekspresja receptorów dla fibronektyny w większości komórek była rozproszona i tylko w komórkach tworzących agregaty była wyraźnie zaznaczona na ich obwodzie (RYS. 3B).

Dyskusja

Z badań wynika, że osteoblasty linii komórkowej Saos-2 adherują do warstwy kompozytowej typu $Ti_3P+(Ti,Ni)$ wytworzonej na stopie tytanu i charakteryzuje je wysoka aktywność biologiczna. Fibronektyna, składnik biofilmu wytworzonego na biomateriale tworzy skupiska w niektórych obszarach powierzchni biomateriału. Nie można wykluczyć, że te miejsca wykazują specyficzną topografię i/lub skład chemiczny powierzchni, który aktywuje osteoblasty do produkcji fibronektyny. Wysoka ekspresja w błonie komórkowej receptorów dla fibronektyny tylko w niektórych komórkach odpowiada skupieniom fibronektyny w biofilmie. Analiza topografii powierzchni biomateriału wykazała mniejszą chropowatość niektórych obszarów powierzchni wytworzonej warstwy, co prawdopodobnie wpływa na wydzielanie i organizację fibronektyny w biofilmie. Wpływ topografii i składu chemicznego powierzchni biomateriału na syntezę białek tworzących biofilm jest znanym zjawiskiem, opisywanym w literaturze [3-5]. Uzyskane wyniki potwierdzają biogodność wytworzonej warstwy powierzchniowej typu $Ti_3P+(Ti,Ni)$, chociaż topografia powierzchni wymaga dalszej modyfikacji dla zastosowań na implanty kostne.

Podziękowania

Praca finansowana jest przez Komitet Badań Naukowych - projekt badawczy nr: 08/PBZ-KBN 082/T08/2002

POWŁOKI FOSFORANOWO- KRZEMIANOWE I KRZEMIANOWE MODYFIKOWANE CZĄSTKAMI HYDROKSYAPATYTU

M. ROKITA, A. BROŻEK, M. HANDKE

AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY,
FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS,
AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW, POLAND

[Inżynieria Biomateriałów, 38-43, (2004), 141-142]

Powszechnie stosowane na implanty materiały metaliczne nie zapewniają dobrego połączenia pomiędzy implantem a żywą tkanką. Pokrycie implantu cienką powłoką krzemianową lub fosforanową może w wydatny sposób polepszyć właściwości biologiczne powierzchni implantu i zapewnić wytworzenie bezcementowego wiązania pomiędzy tkan-

probably effects synthesis and distribution of fibronectin in biofilm. The influence of surface topography on production of proteins that form biofilm is known fact from the literature [3-5]. Our results confirm biocompatibility of $Ti_3P+(Ti,Ni)$ surface layer produced on Ti-6Al-4V alloy although surface topography requires modification for bone implants application.

Acknowledgements

This study was supported by Polish Scientific Committee (KBN) within project 08/PBZ-KBN 082/T08/2002

Piśmiennictwo

References

- [1] Czarnowska E., Wierzchoń T., Sikorska E., Sowińska A., Syczewska M., Euromat 2001, 7th European Conference on Advanced Materials and Processes, Rimini (2001), Abstr. 310-311
- [2] Czarnowska E., Sowińska A., Cukrowska B., Godlewski M., Wierzchoń T., Ann. Transplant., in press
- [3] Chou L., Firth J. D., Uitto V. J., Brunette D. M., J. Cell. Sci. (1995);108:1563-1673
- [4] Altankov G., Grncl F., Groth T., J. Biomed. Mater. Res. (1996);30:385-391
- [5] Derhami K., Wolfaardt J. F., Wennerberg A., Scott P. G., J. Biomed. Mater. Res. (2000); 52:315-322

PHOSPHO-SILICATE AND SILICATE LAYERS MODIFIED BY HYDROXYAPATITE PARTICLES

M. ROKITA, A. BROŻEK, M. HANDKE

AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY,
FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS,
AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW, POLAND

[Engineering of Biomaterials, 38-43, (2004), 141-142]

Common used metal materials don't ensure good connection between an implant and biological neighbourhood. Covering implants by thin silicate or phosphate layers enable to improve biological properties of implants and create conditions for producing the non-concrete bonding between the implant and tissue.

The project object is development in the field of implant layers technology. Phospho-silicate layers were deposited onto different base materials such as metal (titanium or iron), ceramic or carbon, using sol-gel methods. Deposited sols