

WPŁYW OBRÓBK TERMICZNEJ POWŁOK NA PODŁOŻU TYTANU NA AKTYWNOŚĆ KOMÓREK IN VITRO

ANNA STOCH*, BARBARA CZAJKOWSKA**, ELŻBIETA DŁUGOŃ*,
MAŁGORZATA BOBEK**, ANNA MORAWSKA*

*AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA

WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI, KRAKÓW

**COLLEGIUM MEDICUM UNIWERSYTETU JAGIELLOŃSKIEGO,

KATEDRA IMMUNOLOGII, KRAKÓW

[Inżynieria Biomateriałów, 38-43, (2004), 168-171]

Wprowadzenie

Inżynieria tkankowa in vitro i in vivo obejmuje oddziaływanie komórek z powierzchnią materiału. Natura powierzchni może bezpośrednio wpływać na odpowiedź komórkową, ostatecznie wpływając na szybkość i jakość tworzenia się nowej tkanki.

Czysty tytan i jego stopy są powszechnie stosowanymi materiałami w chirurgii i stomatologii.

Jednakże wiązanie tytanu z żywą kością może trwać kilka miesięcy. Stąd obserwuje się rosnące zainteresowanie w skróceniu procesu osseointegracji a więc i skróceniu pooperacyjnych ograniczeń. Rozwiązania naukowe w tej dziedzinie są ukierunkowane na pokrywanie implantów tytanowych materiałami bardziej przyjaznymi dla otoczenia biologicznego jak hydroksyapatyt, powłoki krzemionkowe, krzemionkowo-tytanowe, wapniowo-krzemionkowo-tytanowe. Do chwili obecnej proponowano wiele sposobów nanoszenia powłok na implanty metaliczne, lecz wszystkie one zawierają pewne ograniczenia. Metoda zol-gel, proponowana przez nas, jest tanią, łatwo dającą się zastosować techniką nanoszenia powłok na różne rodzaje podłoża [4-6].

Celem prezentowanej pracy jest otrzymanie metodą zol-gel powłok na podłożu tytanowym, wygrzanie ich w temperaturach 500°C i 750°C i określenie w warunkach in vitro reakcji fibroblastów i osteoblastów ze zmodyfikowaną powierzchnią tytanu. Reakcje komórkowe badano przez pomiar ich vitalności (po 7 dniach) oraz przez oznaczenie sekrecji kolagenu.

Metodą mikroskopii skaningowej (SEM) badano morfologię powierzchni powłok po obróbce termicznej.

Część doświadczalna

Materiały

Krażki z tytanu (cpTi) o średnicy 20mm

Zol wapniowo-fosforanowy (Ca-P) przygotowany z $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ i żelatyny (pH 6,5-7,9).

Zol krzemionkowy przygotowany z cztereoetoksylanu $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$ (TEOS)

Zol tytanowo-krzemionkowy (Ti-Si) przygotowany z propoksydowej pochodnej tytanu $\text{Ti}(\text{OC}_3\text{H}_7)_4$ i z TEOS

Zol tytanowo-wapniowo-krzemionkowy (TiCS) przygotowany z $\text{Ti}(\text{OC}_3\text{H}_7)_4$, TEOS i $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

Komórki: ludzka linia fibroblastyczna K

ludzka linia osteoblastyczna hFOB 1,19

THE INFLUENCE OF THERMAL TREATMENT OF COATINGS ON TITANIUM SUPPORT ON CELLULAR REACTIONS IN VITRO

ANNA STOCH*, BARBARA CZAJKOWSKA**, ELŻBIETA DŁUGOŃ*,
MAŁGORZATA BOBEK**, ANNA MORAWSKA*

*AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY,

FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS, CRACOW

**COLLEGIUM MEDICUM OF JAGIELLONIAN UNIVERSITY, DEPARTMENT OF IMMUNOLOGY, CRACOW

[Engineering of Biomaterials, 38-43, (2004), 168-171]

Introduction

Tissue engineering in vitro and in vivo involves the interaction of cells with a material surface. The nature of the surface can directly influence cellular response, ultimately affecting the rate and quality of new tissue formation.

Pure titanium and its alloys are the materials commonly used in medical and dental applications. However, their bonding to living bone tissue can take several months. Hence there is growing interest in shortening of the process towards osseointegration, and thereby, reducing the surgical restrictions. A research in this field has been oriented towards coating of the titanium implants with the more tissue friendly material, like hydroxyapatite, silica, silica-titania, calcium-silica-titania coatings [1-3]. Till now many coating procedures of metallic implants have already been suggested, but all of them have shortcomings. More promising between other, the sol-gel method is low cost, flexible technique of coating and it can be applied on a variety of substrates [4-6].

The aim of presented work was to produce sol-gel coatings on titanium, to anneal them at temperatures 500°C and 750°C and in vitro experiments to observe the reactions of fibroblasts and osteoblasts with modified titanium surfaces. The cell's reactions were evaluated by determination of the vitality of fibroblasts and osteoblasts and by the determination of the amount of synthesized collagen. Surface morphology of sol-gel coatings after thermal treatment was observed by scanning electron microscopy (SEM).

Experimental procedure

Materials

Titanium (cpTi) discs 20 mm

Calcium-Phosphate (Ca-P) sol prepared from $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, and $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$

Silica sol (Si-Si) prepared from Tetraethoxysilane $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$ (TEOS)

Titania-silica sol (Ti-Si) prepared from titanium propoxide $\text{Ti}(\text{OC}_3\text{H}_7)_4$ and from TEOS

Titania-calcium-silica sol (TiCS) prepared from titanium propoxide, TEOS and from $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

Human fibroblastic line KMA

Human osteoblastic line hFOB 1,19

Linie komórkowe pochodzą z renomowanego banku komórek ATCC.

Powierzchniowa modyfikacja krążków tytanu metodą zol-żel

Krążki tytanowe o średnicy 20mm czyszczono mechanicznie i chemicznie. Następnie, stosując metodę zol-żel, nanoszono cztery rodzaje powłok: hydroksyapatytową (HAP), krzemionkową, tytanowo-krzemionkową (Ti-Si) lub tytanowo-wapniowo-krzemionkową (TiCS). Nanoszenie powłok wykonano metodą wynurzania krążka tytanowego z odpowiedniego zolu: zol Ca-P z żelatyną dla powłoki HAP, zol TEOS dla powłoki krzemionkowej, zol Ti-Si dla powłoki Ti-Si i zol TiCS dla powłoki TiCS. Krążek tytanu zanurzano do odpowiedniego zolu a następnie wynurzano ze stałą szybkością 20 cm/min. Stała szybkość wynurzania zapewnia jednorodną grubość warstwy. Grubość warstwy regulowano krotnością wynurzeń.

Krążki tytanowe pokryte różnymi rodzajami powłok suszono w temperaturze 500°C i 750°C. Wyrzanie usuwa wodę i substancje organiczne, zagęszcza powłokę i powoduje podwyższenie adhezji powłoki do podłoża.

Testy komórkowe

Jałowienie krążków tytanowych z naniesioną powłoką prowadzono poddając je naświetlaniu UV po 3 minuty z każdej strony. Krążki umieszczano w 12 dołkowej płytce hodowlanej, zadawano 2 ml zawiesiny komórek i ustawia-

2, 95% powietrza w temperaturze 37°C (fibroblasty) lub 34°C (osteoblasty).

Stosowano następujące stężenie komórek i media hodowlane:

Fibroblasty 2×10^4 komórek/ml, medium : RPMI z 10% FCS
Osteoblasty 2×10^4 komórek/ml, medium Dubecco zmodyfikowane podłożę Eagla zmieszane z F-12 Ham DME z 10% FCS.

Żywotność komórek badano po 7 dniach inkubacji, stosując metodę kolorymetryczną przy użyciu testu CellTiter Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay Promega. Wyniki przedstawiono w %, biorąc stosunek liczby komórek, które przeżyły na badanych próbkach do liczby komórek które przeżyły na kontrolnych próbkach (przyjmując jako 100%).

Poziom kolagenu typu I oznaczano w supernatantach fibroblastów i osteoblastów po 7-dniowej hodowli. Pomiar wykonano z użyciem metody ELISA przy zastosowaniu przeciwciał i standardu f-my Bioproducts. Wyniki przedstawiono w ng kolagenu na 1ml supernatantu uzyskanego po 7 dniach hodowli.

Wyniki i dyskusja

Początkowe reakcje przy powierzchni implantu obejmują zorientowaną adsorpcję molekuł z otaczających płynów, wytwarzając w ten sposób granicę międzyfazową względem, której komórki udzielają stosownej odpowiedzi [7].

Morfologia i chemizm powierzchni określają, które molekuly mogą się adsorbować i jaka będzie odpowiedź komórek. Morfologia powłok na krążkach tytanowych użytych w badaniach zależy od obróbki termicznej tych powłok.

Na RYS. 1(a,b), 2(a,b), 3(a,b) przedstawiono morfologię SEM powłok na krążkach tytanowych użytych do badań komórkowych. Badania SEM wykonano na Mikroskopie Elektronowym Phillips XL 30.

Żywotność komórek po 7 dniach wzrostu na powierzchni krążków tytanu pokrytych powłokami oraz całkowitą ilość kolagenu typ I wyprodukowanego przez fibroblasty i osteoblasty przedstawiono w TABELI 2.

Human cell cultures line used in experiments were from bank of American Type Culture Collection (ATCC).

Sol-gel modification of titanium discs

Titanium discs of 20 mm diameter were mechanically and chemically cleaned. Then four types of layers were applied on titanium surface using sol-gel technique: hydroxyapatite layers (HAP), silica, titania-silica (Ti-Si) or titania-calcium-silica (TiCS) layers. Apatite layers on titanium discs were obtained by withdrawing the sample from Ca-P sol, silica layers by withdrawing from TEOS sol. Ti-Si and TiCS sols were used in the forming of Ti-Si or TiCS layers. The discs were placed in the sol solution and then withdrawn at a constant speed 20 cm/min. A constant withdrawal speed ensures an uniform thickness of the layer. Thickness of the sol-gel layers was controlled by multiple dipping and withdrawing of the disc from the sol. Titanium discs covered with the layers were dried and heated. The annealing removes water and residual organic substances, densifies the film and increases the extent of bonding between the film and the substrate.

The type of coatings are collected in TABLE 1.

Powłoka Layer	Symbol Cod	T°C	T°C
Hydroksyapatytowa Hydroxyapatite	Ca-P sol	500°C	750°C
Krzemionkowa Silica	TEOS	500°C	750°C
Krzemionkowo-tytanowa Silica-titania	Si-Ti sol	500°C	750°C
Tytanowo-wapniowo-krzemionkowa Titania-calcium-silica	Ti-Ca-Si sol	600°C	

TABELA 1. Powłoki zol-żel nałożone na krążki tytanowe.

TABLE 1. Sol-gel coatings on titanium discs.

Cellular tests

The coated titanium discs were sterilized by UV irradiation during 3 minutes for each side of the disc.

Cell cultures were run in 12 well plates at the bottom of which the tested disks of 20 mm in diameter were immersed in 2 ml of the cell suspension. Then the cultures were run in an incubator in the atmosphere of 5% CO₂ in air at 37°C (fibroblasts) or 34°C (osteoblasts) over seven days.

The following concentrations of cells and culture media were used:

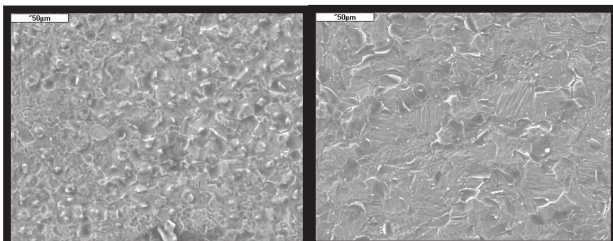
Fibroblasts 2×10^4 of cells/ml medium (RPMI + 10% FCS).
Osteoblasts 2×10^4 of cells/ml (Dulbecco's modified Eagle's medium nutrient mixture F-12 HAM/DME, 0,3 mg/ml G-418, 10% FCS).

Cells viability (vitality) was examined using a colorimetric method and test Cell/Titer Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay Promega. The results are presented in % relating the number of cells which survived on the test samples to the number of cells which survived on the control samples (taken as 100%).

The level of collagen (type I) after seven days of culture growth has been determined in the supernatants over the fibroblasts and osteoblasts. The measurements were performed by means of ELISA tests using standards from Bioproducts firm. The results were shown in ng of collagen per 1ml of supernatant after 7 days of culture growth.

Results and discussion

Initial events at the surface include the orientated adsorption of molecules from the surrounding fluid, creating a conditioned interface to which the cell responds [7].



RYS. 1. Morfologia SEM warstwy krzemionkowej wygrzanej w 500°C (a) i w 750°C (b).

FIG. 1. SEM morphology of silica layer annealed at 500°C (a) and at 750°C (b).

Jak można zauważyć, obydwa typy komórek, fibroblasty i osteoblasty, reagują odmiennie na różnych powłokach i przy różnych temperaturach wygrzewania powłok. Obniżka temperatury z 750°C do 500°C powoduje obniżkę przeżywalności fibroblastów. Dla przeżywalności osteoblastów najlepsze są powłoki krzemionkowe i Ti-Si; niższa temperatura (500°C) wygrzewania stwarza warunki wyższej przeżywalności osteoblastów na obydwu powłokach. Podobne obserwacje można poczynić dla powłoki HAP. Dobre wyniki uzyskano dla powłoki TiCS. Jej morfologia (RYS. 3a,b) pokazuje gładką, nisko porowatą powierzchnię, na której przeżywalność osteoblastów jest stosunkowo wysoka.

Ilość kolagenu I wyprodukowanego przez komórki na badanych powłokach stanowi ważną, praktyczną informację np. co do doboru rodzaju obróbki termicznej powłoki, doboru jej składu chemicznego czy doboru odpowiedniego miejsca jej zastosowania. Całkowita ilość kolagenu I wyprodukowanego w supernatantach na badanych powłokach przez fibroblasty i osteoblasty po 7 dniach inkubacji jest umieszczona w TABELI 2.

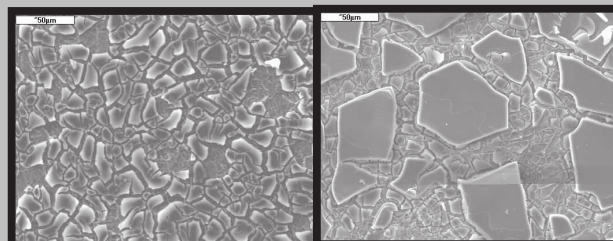
Powłoki: krzemionkowa, Ti-Si i TiCS wygrzane w 750°C stwarzają lepsze warunki dla produkcji kolagenu przez fibroblasty. Ilość kolagenu produkowanego przez osteoblasty na powierzchni TiCS jest wysoka. Może to sugerować, że tytan z warstwą TiCS może być z powodzeniem stosowany w chirurgii kostnej. Podobne sugestie można wysunąć w kierunku powłoki krzemionkowej i krzemionkowo-tytanowej. Niższa temperatura wygrzewania tych powłok prowadzi do tworzenia się amorficznych, gładkich warstw stwarzających lepsze warunki przeżywalności dla osteoblastów. Takie powłoki zawierają więcej grup silanolowych -Si-OH na powierzchni i wydają się być bardziej biologicznie aktywne niż powłoki wygrzane w wyższej temperaturze.

Wnioski

Zaobserwowano różną reakcję fibroblastów i osteoblastów na różną modyfikację powierzchni tytanu. Warstwy:

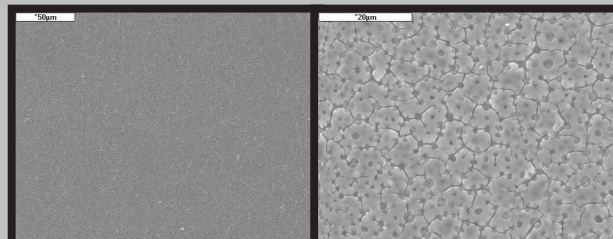
Powłoka Coating	Zywność Fibr., Vitality Fibr [%]	Coll.Fibr. [ng/ml]	Zywność Ostob., Vitality Ostob. [%]	Coll.Osteob. [ng/ml]
Silica 500°C	37	4,5	59	68,3
Silica 750°C	72	106,1	39	104,1
Ti-Si 500°C	32	4,6	73	72,7
Ti-Si 750°C	53	122,8	50	62,5
HAPsg 500°C	-	-	41	42,9
HAPsg 750°C	13	14	1	6
TiCS 600°C	62	71,7	75	164,9

TABELA 2. Żywność fibroblastów i osteoblastów i całkowita ilość kolagenu typu I.
TABLE 2. Vitality of fibroblasts and osteoblasts and total amount of collagen type I.



RYS. 2. Morfologia SEM warstwy tytanowo-krzemionkowej wygrzanej w 500°C(a) i w 750°C(b).

FIG. 2. SEM morphology of titania-silica layer annealed at 500°C (a) and at 750°C (b).



RYS. 3. Morfologia SEM warstwy TiCS wygrzanej w 600°C (500x) (a) i (2000x) (b).

FIG. 3. SEM morphology of TiCS layer annealed at 600°C (500x) (a) and (2000x) (b).

Morphology and chemistry of the surface determine molecules that can adsorb and how will be cellular response. Surface morphology of titanium discs used in our study depends on thermal treatment of the layer.

FIGURES 1(a,b), 2(a,b), 3(a,b) show the SEM morphology of layers before cellular tests.

Cell viability after 7-day culture on titanium surfaces and total amount of collagen type I produced by fibroblasts and osteoblasts are presented in TABLE 2.

As it may be noticed, both types of cells: fibroblasts and osteoblasts react differently to different surface layers and temperatures of annealing. Generally, lowering the temperature of annealing from 750°C to 500°C gives the lowering of fibroblasts vitality. For viability of osteoblasts the best coatings are silica and titania-silica coatings; lower temperature annealing (500°C) gives a higher vitality of osteoblasts for both coatings. The same observations are for hydroxyapatite sol-gel layer. Good results were obtained for TiCS coatings annealed at 600°C. Morphology of this coating (FIG. 3) shows very smooth, low porous surface on which vitality of osteoblasts is relatively high.

The secretion of collagen produced by cells on the tested surfaces gives important practical information to e.g. choice of thermal treatment of the layer, choice of chemical composition of the layer or a convenient place for anatomic application. The total amount of collagen I produced by both types of cells on the tested surface was determined in supernatant (liquids) after a seven-day culture. The results are shown in TABLE 2.

Silica, Ti-Si and TiCS surfaces annealed at 750°C create better conditions for the secretion of collagen produced by fibroblasts.

Amount of collagen produced by osteoblasts on TiCS surface is high. It suggests that titanium with TiCS layer can be successfully used in bone tissue region. Similar suggestions can be directed to silica and silica - titania coatings.

Lower annealing temperature leads to formation of more amorphous, smooth sol-gel layers that create better condi-

krzemionkowa, Ti-Si i TiCS wygrzane w 750°C stwarzają dość dobre warunki dla przeżywalności fibroblastów i dla ilości produkowanego przez nie kolagenu I. Obniżenie temperatury wygrzewania powłok do 500°C obniża przeżywalność fibroblastów, podczas gdy przeżywalność osteoblastów na powłokach: krzemionkowej, Ti-Si i TiCS jest wyższa. Obróbka termiczna powłok wpływa na ich morfologię jak również na aktywność chemiczną grup powierzchniowych np. grup silanolowych.

Podziękowania

Praca realizowana w ramach projektu badawczego Komitetu Badań Naukowych PBZ-KBN-082-T08/2002

Piśmiennictwo

- [1] A. Stoch, A. Brożek, G. Kmita, J. Stoch, W. Jastrzębski, A. Rakowska, J. Mol. Struct. 596 (2001) 191-200.
 [2] A. Stoch, C. Paluszkiwicz, T. Gibała, A. Bolek, J. Mol. Struct. 293 (1993) 287-290.
 [3] A. Stoch, A. Brożek, J. Stoch, W. Jastrzębski, E. Długoń, M. Sitko, Engineering of Biomaterials, No10 (2000) 23-29.
 [4] Ph. Colombari, Ceramics International 15 (1989) 23-50.

WPLYW WYBRANYCH NAPEŁNIACZY PROSZKOWYCH NA WŁAŚCIWOŚCI KOMPOZYTÓW NA BAZIE ŻYWICY BIS-GMA

JOANNA ROMANIUK*, MAŁGORZATA LEWANDOWSKA**,
JAN RYSZARD DĄBROWSKI*, KRZYSZTOF J. KURZYDŁOWSKI*

*POLITECHNIKA BIAŁOSTOCKA, WYDZIAŁ MECHANICZNY,
UL. WIEJSKA 45C, 15-351 BIAŁYSTOK

**POLITECHNIKA WARSZAWSKA,
WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ,
UL. WOŁOSKA 141, 02-507 WARSZAWA

Streszczenie

W pracy przedstawiono wyniki badań wpływu proszkowych napełniaczy w postaci ceramiki, nanokrzemionki oraz modyfikatorów tarcia (Si_3N_4 , BN, teflon, polietylen) na właściwości kompozytów polimerowych na bazie żywicy Bis-GMA. Oceniano wpływ czasu homogenizacji i czasu polimeryzacji kompozytów na ich strukturę i parametry wytrzymałości-

tions for osteoblasts viability. Such coatings contain more silanol groups on the surface and seem to be biologically active more than coatings annealed at higher temperatures.

Conclusions

Different reactions of fibroblasts and osteoblasts to different modifications of titanium surface have been observed. Silica, silica titania and TiCS layers (750°C) create relatively good conditions for fibroblasts viability and for the secretion of collagen type I. Decreasing the temperature of annealing from 750°C to 500°C lowers the fibroblasts viability while osteoblasts viability for silica, Si-Ti and TiCS coatings becomes higher. Thermal treatment influences morphology of the layers and also chemical activity of the surface groups, i.e. silanol groups.

Acknowledgements

The Polish State Committee for Scientific Research project PBZ-KBN-082-T08/2002 supported this work.

References

- [5] A. Stoch, W. Lejda, A. Rakowska, Metall. Foundry Eng., 18 (1992) 233-239.
 [6] H. Matraszek, A. Stoch, C. Paluszkiwicz, A. Brożek, E. Długoń, Engineering of Biomaterials, No 23-25 (2002) 72-74.
 [7] B. D. Boyan, T.W. Hummert, D.D. Dean, Z. Schwartz, Biomaterials 17 (1996) 137-146.

THE EFFECT OF SELECTED POWDER FILLERS ON PROPERTIES OF THE BIS-GMA RESIN BASED COMPOSITES

JOANNA ROMANIUK*, MAŁGORZATA LEWANDOWSKA**,
JAN RYSZARD DĄBROWSKI*, KRZYSZTOF J. KURZYDŁOWSKI*

*BIAŁYSTOK UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,
MECHANICAL ENGINEERING,
WIEJSKA 45C STREET, 15-351 BIAŁYSTOK,

**WARSAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,
MATERIALS SCIENCE AND ENGINEERING FACULTY,
WOŁOSKA 141 STREET, 02-507 WARSAW

Abstract

This work presents results of the investigations on the influence of powder fillers including ceramic, nanosilica and friction modifiers (Si_3N_4 , BN, teflon, polyethylene) on properties of the Bis-GMA resin based polymer composites. The influence of the homogenization time and the polymerization time of composites on their structure and strength parameters was observed. The effect of those additives on