

skiej na symulatorach stawu biodrowego wynika, iż opory tarcia w tych parach trących są duże. Wyniki pomiarów współczynnika tarcia na symulatorze ilustruje RYS.5.

Jak to ilustruje RYS.5 najbardziej niekorzystną jest para trącą typu "metal-metal".

Wnioski

1) Rodzaj zastosowanych materiałów na elementy trące endoprotez ma istotny wpływ na ich trwałość.

2) Przy doborze materiałów na pary trące należy uwzględnić i analizować oddziaływanie produktów zużycia na organizm ludzki.

WPŁYW STERYLIZACJI NA ADHEZJĘ LUDZKICH FIBROBLASTÓW DO BIOMATERIAŁÓW

AGNIESZKA SOWIŃSKA, BOŻENA CUKROWSKA, ELŻBIETA CZARNOWSKA

ZAKŁAD PATOLOGII,
INSTYTUT-POMNIK CENTRUM ZDROWIA DZIECKA, WARSZAWA

Wstęp

Ocena adhezji komórek do podłoża jest jednym z parametrów umożliwiających weryfikację materiału pod względem jego zastosowań w medycynie jako biomateriał. Proces adhezji komórek na biomateriale jest możliwy jeśli na jego powierzchni odłożą się białka substancji pozakomórkowej oraz zostaną aktywowane na powierzchni komórek receptory dla białek adhezyjnych. Jednym z białek pośredniczących w procesie adhezji komórek jest fibronektyna a głównym receptorem dla niej jest integryna $\alpha 5\beta 1$. Receptory po połączeniu z odpowiednimi ligandami skupiają się i tworzą w miejscach najsilniejszej adhezji do substratu tzw. płytki adhezyjne. Sterylizacja jest ważnym czynnikiem wpływającym na interakcję biomateriałów z tkanką. Zależnie od zastosowanej metody może ona zmieniać topografię, energię lub zwilżalność powierzchni co w efekcie wpływa na adhezję [1], proliferację i żywotność komórek [2].

Przedmiotem naszych badań było określenie wpływu różnych rodzajów sterylizacji na adhezję ludzkich fibroblastów do próbek wykonanych ze stopu tytanu Ti-1Al-1Mn oraz z wytworzonymi warstwami powierzchniowymi typu TiN i $(\text{Ti,Ni})_3\text{P}$. Zdolność adhezyjną komórek badano mierząc ekspresję fibronektyny oraz jej receptora - integryny $\alpha 5\beta 1$ przy użyciu cytometrii przepływowej [3].

Materiały i metody

W doświadczeniu użyto próbki o średnicy 20 mm i grubości 3mm wykonane ze stopu tytanu Ti-1Al-1Mn oraz z wytworzonymi w warunkach wylądowania jarzeniowego warstwami typu TiN i $(\text{Ti,Ni})_3\text{P}$. Próbki poddano sterylizacji w autoklawie (para wodna, temperatura 134°C, ciśnienie 1400 hPa, 30 min.) w 10 cyklach lub sterylizacji plazmowej (nadtlenek wodoru, temperatura 54°C, ciśnienie 7 hPa, 1 godz.) w 1 cyklu. Zastosowany rodzaj sterylizacji wybrano na podstawie wcześniejszych badań wskazujących, że wie-

Piśmiennictwo

- [1] Prospekty firmy AESCULAP,
[2] Prospekty firmy BIOMET-MERCK

References

EFFECT OF STERILIZATION ON ADHESION OF HUMAN FIBROBLASTS TO BIOMATERIALS

AGNIESZKA SOWIŃSKA, BOŻENA CUKROWSKA, ELŻBIETA CZARNOWSKA

PATHOLOGY DEPARTMENT,
THE CHILDREN'S MEMORIAL HEALTH INSTITUTE, WARSAW

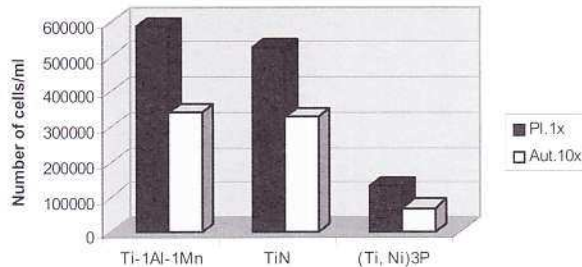
Introduction

Adhesion of cells to a substrate is one of the prerequisites for assuming the applicability of biomaterials for medical applications in humans. Adhesion depends on adsorption of protein on the material's surface and activation of cell membrane receptors for the adhesion proteins belonging to integrin superfamily. One of the extracellular proteins adsorbed on the material is a fibronectin, which interacts with integrin $\alpha 5\beta 1$. When they are link, a cluster of focal adhesion plaques is formed. Sterilization is an important factor influencing the interaction between the tissue and biomaterial by modifying surface topography, energy and wettability affecting adhesion [1], proliferation and viability [2] of cells.

In the present study, we evaluated the influence of various sterilization processes on adherence of human fibroblasts to Ti-1Al-1Mn titanium alloy and to surface layers of the TiN or $(\text{Ti,Ni})_3\text{P}$ type. Cell adhesive ability was analysed by measuring the expression of fibronectin and its receptor, integrin $\alpha 5\beta 1$ by flow cytometry [3].

Materials and methods

Specimens in the shape of discs, 20 mm in diameter and 3 mm thick prepared from titanium alloy with TiN or $(\text{Ti,Ni})_3\text{P}$ surface layers produced under glow discharge conditions were exposed to sterilization in a steam autoclave (steam, 134°C, 1400 hPa, 30 min) in one cycle or in plasma-sterrad 100 (hydrogen superoxide, 54°C, 7 hPa, 1h) in ten cycles. These types of sterilization were chosen based on the results of our previous investigations showing that multiple sterilization in steam intensively affects TiN surface topography resulting in decreased proliferation and viability of fibroblasts, while plasma sterilization increased



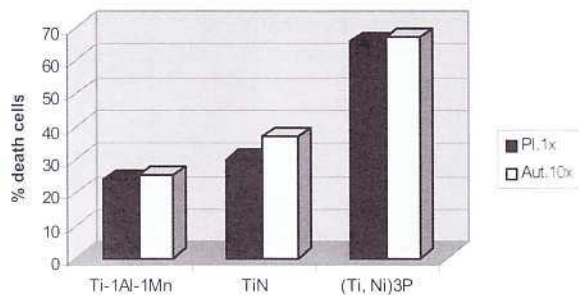
RYS.1. Ilość fibroblastów zliczona w komorze Burckera
FIG.1. Total number of fibroblasts counted in Burcker's camera

lokrotna sterylizacja w parze wodnej zmieniając topografię powierzchni TiN wpływała negatywnie na proliferację i żywotność fibroblastów, podczas gdy sterylizacja plazmowa podwyższając energię powierzchniową stwarzała korzystne warunki dla wzrostu komórek [2,4,5]. Ludzkie fibroblasty otrzymane ze skóry przedramienia i hodowane w płynie inkubacyjnym Dulbecco z dodatkiem cielejącej surowicy płodowej oraz antybiotyków, w wilgotnej atmosferze 95% powietrza i 5% CO₂ nanoszono na próbki w ilości 5x10⁵/ml i inkubowano 48 godzin. Fibroblasty odzyskiwano za pomocą nieenzymatycznego odczynnika Cell Dissociation Solution (Sigma). Po przemyciu komórek określono ich żywotność metodą chłonicia błękitu trypanu. Po policzeniu komórek w komorze Burckera znakowano je przeciwciałami anti-ludzka fibronektyna - fikoerytryna (PE) i anty-receptor fibronektyny-PE (CD49e-PE). Ekspresję receptorów mierzono po podaniu jodku propidyny z wykorzystaniem cytometru przepływowego firmy Becton Dickinson [3].

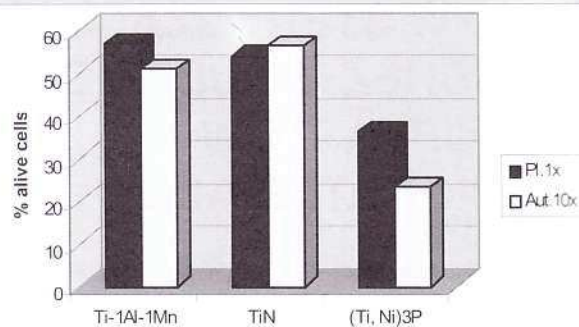
Wyniki i dyskusja

Analiza ilości fibroblastów i ich żywotności wykazała, że liczba komórek odzyskanych z próbek (Ti,Ni)₃P (RYS.1) i ich żywotność (RYS.2) były mniejsze niż z próbek Ti-1Al-1Mn i TiN. Ilość i żywotność fibroblastów odzyskanych z próbek Ti-1Al-1Mn i TiN były porównywalne. Wyniki analizy w cytometrze przepływowym potwierdzają badania w komorze Burckera (RYS.3). Badania w cytometrze przepływowym fibroblastów inkubowanych na próbkach ze stopu tytanu oraz pokrytych warstwami TiN lub (Ti,Ni)₃P, zarówno po sterylizacji w plazmie, jak i w autoklawie nie wykazały obecności fibronektyny na powierzchni komórek. Białko to prawdopodobnie pozostało na powierzchni badanych materiałów. Ponadto dane uzyskane z analizy ekspresji receptora fibronektyny nie wykazały statystycznych różnic, zarówno pod względem rodzaju próbek, jak i sterylizacji.

W świetle uzyskanych wyników można przypuszczać, że fibroblasty wykazujące najsilniejszą adhezję pozostały na powierzchni materiału a analizie poddano komórki, które łatwiej odklejały się. Jeśli tak, to powierzchnia typu (Ti,Ni)₃P bez względu na zastosowaną metodę sterylizacji stwarza najkorzystniejsze warunki dla adhezji komórek. Kontynuowane w tym zakresie badania z zastosowaniem mikroskopu fluorescencyjnego wykorzystującego światło odbite umożliwią bezpośrednie zbadanie białek na powierzchni materiału i ekspresję receptorów na powierzchni komórek. Należy ponadto podkreślić, że warstwy powierzchniowe typu (Ti,Ni)₃P charakteryzują się dobrą odpornością korozyjną oraz znacznie lepszą niż stopy tytanu odpornością na zużycie przez tarcie [4,5], co stwarza podstawę do ich zastosowania w medycynie.



RYS.2. Komórki martwe w populacji fibroblastów liczonej w komorze Burckera
FIG.2. Dead cells in the population of fibroblasts counted in Burcker's camera



RYS.3. Żywe fibroblasty w populacji badanej w cytometrze przepływowym
FIG.3. Percent of living fibroblasts in the cell population based on flow cytometry

surface energy, improving the surface affinity for cells [2,4,5]. Human skin fibroblasts cultured in Dulbecco medium (Sigma) supplemented with 15% foetal bovine serum, antibiotics and antifungal agents, in atmosphere 95% air and 5% CO₂ were plated on samples in an amount of 5x10⁵/ml and incubated for 48 hours. The cells were harvested from the culture by nonenzymatic chemical Cell Dissociation Solution (Sigma). Their viability was analysed with trypan blue staining and counted using a Burcker's camera. The cells were then marked with anti-human fibronectin - phycoerythrin (PE) and anti-fibronectin receptor -PE (CD49e-PE) antibodies and analysed using a Becton Dickinson flow cytometer after addition of propidium iodide [3].

Results and discussion

Data show that the number of fibroblasts (FIG.1) and their viability (FIG.2) was lower on samples with a (Ti,Ni)₃P type layer than on titanium alloy or samples with a TiN layer. The number and viability of cells retrieved from a Ti-1Al-1Mn alloy and from samples with a TiN layer were comparable. Flow cytometry analysis was in agreement with results obtained using Burcker's camera (FIG.3). Fibroblasts incubated on titanium alloy samples or with TiN or (Ti,Ni)₃P layer sterilised either in plasma or in a steam autoclave did not present fibronectin on the cell surface. This protein probably remained on the surface of the material. Analysis of fibronectin receptor expression showed lack of significant differences in relation to sample type and sterilisation.

It can be assumed that fibroblasts characterised by high strength of cell-material adhesion remained on the material surface and that we actually analysed the cells with weak adherence to the material. If so, this means that the (Ti,Ni)₃P surface layer presents high surface affinity for cell adhe-

Podziękowania

Badania finansowane przez Komitet Badań Naukowych
- projekt nr 7T08C 01918

Piśmiennictwo

References

- [1]. Doundoulakis JH, D.M.D., M.S., J. Prosth. Dent, 58(4): 471-478, 1987.
- [2]. Czarnowska E, Wierzchoń T, Sowińska A, et al., Annales Academiae Medicae Silesiensis, Supl. 31: 87-92, 2000.
- [3]. Lopes MA, Knowles JC, Kuru L, et al., J. Biomed. Mater. Res., 41: 649-656, 1998.
- [4]. Czarnowska E, Wierzchoń T, Sikorska A, et al., EuroMat 2001 Conference Proceedings, Rimini 310-315, 2001
- [5]. Wierzchoń T, Czarnowska E, Sikorska E, et al., 15th Int. Symp. Plasma Chemistry Proceedings, Orleans, France, 5: 2001-2006, 2001

WPŁYW OBRÓBEK JARZENIOWYCH NA STRUKTURĘ, WŁAŚCIWOŚCI I BIOZGODNOŚĆ WARSTW NIKLOWO - FOSFOROWYCH NA STOPIE TYTANU Ti- 1Al-1Mn

E. SIKORSKA-MATYSIAK*, E. CZARNOWSKA**, T. WIERZCHOŃ*

*WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ,

POLITECHNIKA WARSZAWSKA, WARSZAWA.

**INSTYTUT POMNIK "CENTRUM ZDROWIA DZIECKA", WARSZAWA.

Wprowadzenie

Tytan i jego stopy charakteryzują się bardzo dobrą odpornością korozyjną, biogodnością, dobrą wytrzymałością zmęczeniową oraz niską gęstością, co kwalifikuje ten materiał do grupy najbardziej perspektywicznych biomateriałów metalicznych. Wymaga on jednak dodatkowej obróbki powierzchniowej ze względu na niską odporność na zużycie przez tarcie, a także zjawisko przechodzenia tytanu do otaczających tkanek [1,2,3].

W artykule przedstawiono wyniki badań metalograficznych, mikrotwardości, składu fazowego, odporności na zużycie przez tarcie i korozję oraz badania biologiczne in vitro prowadzone na ludzkich fibroblastach warstw kompozytowych typu $(Ti,Ni)_3P+Ti_3P+(Ti,Ni)$ wytworzonych na stopie tytanu Ti-1Al-1Mn poprzez połączenie chemicznego niklowania bezprądowego z obróbką jarzeniową [3,4].

Metodyka badawcza

Próbki ze stopu tytanu Ti-1Al-1Mn o następującym składzie chemicznym (1.0%Al, 0.9%Mn, 0.3%Cr, 0.3%Fe, 0.12%Si, reszta Ti) zostały pokryte warstwą niklowo-fosfo-

sion independent of sterilization. Taking into consideration that $(Ti,Ni)_3P$ surface layers are characterised by good corrosion resistance and significantly better wear resistance than titanium alloy [4,5] it can be assumed that these layers produced on titanium alloy could find applications in medicine.

Acknowledgements

These investigation are supported by the Polish State Committee for Scientific Research - project 7T08C1918

EFFECT OF GLOW- DISCHARGE ASSISTED TREATMENTS ON THE STRUCTURE, PROPERTIES AND BIOCOMPATIBILITY OF THE NICKEL- PHOSPHORUS LAYERS FORMED ON A TITANIUM ALLOY Ti-1Al-1Mn

E. SIKORSKA-MATYSIAK*, E. CZARNOWSKA**, T. WIERZCHOŃ*

*FACULTY OF MATERIALS SCIENCE,

WARSAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, WARSZAWA, POLAND.

**THE CHILDREN'S MEMORIAL HEALTH INSTITUTE, WARSAW,
POLAND.

Introduction

Titanium and its alloys are characterised by a very good corrosion resistance, good biocompatibility, high fatigue strength and low density, properties which qualify these materials to be included in the group of the most prospective metallic biomaterials. Because, however of their low frictional wear resistance and the release of elements of titanium alloys into the surrounding human tissues, they require an additional surface treatment [1,2,3].

The paper presents the results of examination of the properties of composite layers of the $(Ti,Ni)_3P+Ti_3P+(NiTi)$ type produced on Ti-1Al-1Mn titanium alloy by a combination of electroless chemical nickel plating and a glow-discharge assisted treatment. The properties examined included: metallographical features, microhardness, phase composition, resistance to frictional wear and corrosion, and in vitro biological properties [3,4].

Materials and methods

Titanium samples with chemical composition (1.0%Al, 0.9%Mn, 0.3%Cr, 0.3%Fe, 0.12%Si, Ti-balance) were