

ANALIZA ZMIAN W EKSPRESJI GENÓW CYKLU KOMÓRKOWEGO W KOMÓRKACH OSTEOBLASTÓW HODOWANYCH NA POWIERZCHNIACH STOPÓW TYTANU

M. WALKOWIAK-PRZYBYŁO^{1*}, P. KOMOROWSKI², W. JAKUBOWSKI²,
L. KLIMEK¹, B. WALKOWIAK²

POLITECHNIKA ŁÓDZKA:

¹ZAKŁAD BADAŃ MATERIALÓW,

²ZAKŁAD BIOFIZYKI

*MAILTO:MMWALKOWIAK@WP.PL

[Inżynieria Biomateriałów, 116-117, (2012), 46-48]

Ze względu na rosnącą potrzebę szybkiej i wiarygodnej weryfikacji biogodności nowych materiałów przeznaczonych do implantacji, zastosowanie technik biologii molekularnej w obszarze inżynierii biomateriałów nabiera coraz większego znaczenia. Wiadomo, że wszczepiony biomateriał nie pozostaje obojętny wobec kontaktujących się z nim komórek i może być postrzegany jako potencjalne źródło stresu. Efektem mogą być zmiany w ekspresji genów i białek, przejawiające się w zróżnicowanej odpowiedzi metabolicznej komórek, co z kolei może mieć przełożenie na ostateczną akceptację implantu przez tkanki i organizm biorcy. Powyższe obserwacje skłaniają do sformułowania następującej tezy: Zarówno skład chemiczny biomateriału, jak i struktura jego powierzchni, wywierają mierzalny wpływ na metaboliczną odpowiedź komórek kontaktujących się z tą powierzchnią.

Badaniem aktywności genów ulegających ekspresji w komórce zajmuje się transkryptomika, wykorzystująca różnorodne techniki biologii molekularnej (qRT-PCR, Northern blotting, mikromacierze cDNA). Celem naszej pracy jest analiza zmian w ekspresji genów cyklu komórkowego w komórkach ludzkich osteoblastów linii Saos-2 (ATCC, Manassas, USA) hodowanych na polerowanych i piaskowanych powierzchniach stopów tytanu Ti6Al4V (ISO 5832-3) oraz Ti6Al7Nb (ISO-5832-11), z wykorzystaniem zestawu mikromacierzy cDNA (Cell Cycle Oligo GEMatrix-Human, SABiosciences). Pomimo wieloletniej i bardzo szerokiej aplikacji tytanu i jego stopów w obszarze implantologii i medycyny, nadal nie w pełni poznano molekularny aspekt interakcji tytan/stop tytanu-komórka.

Próbki stopów tytanu o wymiarach 3 mm grubości oraz 20 mm średnicy szlifowano na wodnych papierach ściernych o malejącej gradacji ziaren, a następnie polerowano zawiesiną tlenkową na bazie koloidalnego roztworu krzemionki (Struers). Część krążków poddano następnie piaskowaniu ziarnem Al₂O₃ o wielkości 110 μm, padającym pod kątem 45° przy ciśnieniu 4,5 Bar. Próbki myto w myjce ultradźwiękowej w acetonie przez 10 min i w wodzie dejonizowanej przez kolejne 10 min.

Hodowlę osteoblastów na polerowanych i piaskowanych powierzchniach Ti6Al4V i Ti6Al7Nb poprzedzono sterylizacją parową badanych krążków. Po sterylizacji próbki inkubowano przez 48h z zawiesiną osteoblastów w pełnym medium hodowlanym (McCoy's 5a Modified Medium z dodatkiem 15% płodowej surowicy bydłowej (FBS), penicyliny i streptomycyny) w temperaturze 37°C, przy wilgotności względnej 100%, w obecności 5% CO₂. Równolegle przygotowano próby kontrolne, które stanowiły komórki nie poddane kontaktowi z biomateriałem (kontrola) oraz komórki podda-

ANALYSIS OF CHANGES IN CELL CYCLE GENE EXPRESSION IN OSTEOBLASTS CULTURED ON THE SURFACES OF TITANIUM ALLOYS

M. WALKOWIAK-PRZYBYŁO^{1*}, P. KOMOROWSKI², W. JAKUBOWSKI²,
L. KLIMEK¹, B. WALKOWIAK²

TECHNICAL UNIVERSITY OF LODZ:

¹DEPARTMENT OF MATERIALS' RESEARCH,

²DEPARTMENT OF BIOPHYSICS

*MAILTO: MMWALKOWIAK@WP.PL

[Engineering of Biomaterials, 116-117, (2012), 46-48]

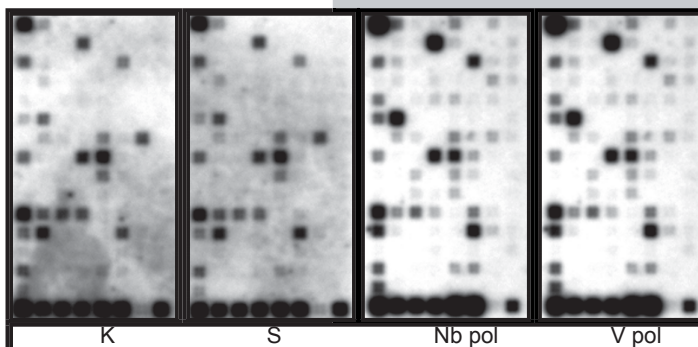
Due to the increasing need for rapid and reliable verification of biocompatibility of new materials intended for implantation, the application of molecular biology techniques in the field of biomaterials engineering is becoming extremely important. It is commonly known that implanted material is not neutral for cells contacting its surface and can be considered as the potential source of stress for these cells. As a result of implant-cell interaction changes in genes and proteins' expression, manifested in metabolic cell response, can be observed, and they may be related with the final implant acceptance by the patient's tissues. Above observations have lead to the formulation of the following thesis: Both the biomaterial composition and its surface topography, have a measurable impact on the metabolic response of cells being in contact with the surface of biomaterial.

The discipline that enables to evaluate the activity of genes undergoing expression in cells is transcriptomics, using various techniques of molecular biology (qRT-PCR, Northern blotting, cDNA microarrays). The aim of our study is to analyze changes in cell cycle gene expression in human osteoblasts line Saos-2 (ATCC, Manassas, USA) cultured on polished and sandblasted surfaces of titanium alloys Ti6Al4V (ISO 5832-3) and Ti6Al7Nb (ISO-5832-11), with the use of cDNA microarrays (Cell Cycle Oligo GEMatrix-Human, SABiosciences). Despite the long and very broad applications of titanium and its alloys in the field of implantology and medicine, the molecular aspect of titanium/titanium alloy-cell interaction is still not well understood.

Disc-shaped samples of titanium alloys, 20 mm in diameter and 3 mm thick, were grinded on abrasive papers of decreasing grain grit and polished with silica-based paste (Struers). Additionally, some samples of each alloy were sandblasted with Al₂O₃ grains 110 μm in size, hitting the surface at a 45° angle and a pressure of 4,5 Bar. Then the samples were cleaned in an ultrasonic bath in acetone for 10 minutes and in deionised water for the next 10 minutes.

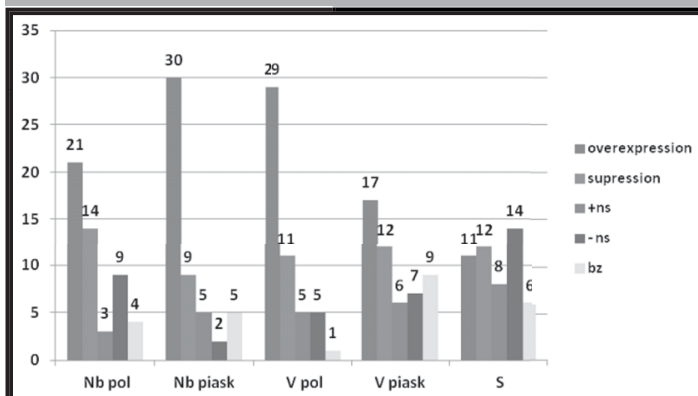
The culture of Saos-2 cells on polished and sandblasted surfaces of Ti6Al4V and Ti6Al7Nb alloys was preceded with steam sterilization of the samples. After autoclaving the samples were incubated for 48h with suspension of osteoblastic cells Saos-2 in full medium (McCoy's 5a Modified Medium supplemented with 15% fetal bovine serum (FBS), penicillin and streptomycin) at 37°C, in the atmosphere of 5% CO₂ and relative humidity 100%. Control samples were prepared as well: cells that were not in contact with any examined material (control) and cells that were grown on the surface of polished medical steel AISI 316L (reference sample). After 48h the cells on the examined surfaces were lysed with a solution of phenol and guanidine isothiocyanate (TRIzol Reagent) and RNA isolation procedure was performed.

ne kontaktowi z polerowaną powierzchnią stali medycznej AISI 316L (tzw. próbka referencyjna). Po upływie 48h komórki na badanych powierzchniach lizowano za pomocą roztworu fenolu i izotiocyanianu guanidyny (TRIzol Reagent) i przeprowadzono procedurę izolacji RNA. Następnie cząsteczki RNA amplifikowano i znakowano biotyną przy użyciu zestawu MessageAmp™ II-Biotin Enhanced Kit (Ambion). Membrany mikromacierzy poddane wcześniejszej prehybrydacji inkubowano z próbkami RNA przez 12h w 60°C, następnie blokowano wolne miejsca buforem blokującym i inkubowano z kompleksem streptawidyna-fosfataza alkaliczna. Dodatek CDP-Star umożliwił uzyskanie obrazu transkryptomu metodą chemiluminescencyjną na filmie rentgenowskim. Do analizy densytometrycznej obrazów mikromacierzy wykorzystano program ImageQuant TL (GE Healthcare). Przykładowe obrazy mikromacierzy dla polerowanych stopów Ti6Al4V i Ti6Al7Nb przedstawia RYS. 1.



RYS. 1. Obrazy mikromacierzy cyklu komórkowego po hybrydacji z transkryptomem osteoblastów hodowanych na powierzchniach polerowanych stopów tytanu, kontroli i próbce referencyjnej: K - kontrola, S - stal AISI 316 L, Nb pol - polerowany Ti6Al7Nb, V pol - polerowany Ti6Al4V.

FIG. 1. Images of the cell cycle microarray after hybridization with the transcriptome of osteoblasts cultured on polished titanium alloys, control and reference sample: K - control, S - stainless steel AISI 316 L, Nb pol - polished Ti6Al7Nb, V pol - polished Ti6Al4V.



RYS. 2. Liczba i rodzaj zmian w ekspresji genów cyklu komórkowego w komórkach osteoblastów hodowanych na powierzchniach badanych biomateriałów. Za nadekspresję genów przyjęto wartość ilorazu intensywności zaczerpnienia spotu badanego do spotu kontrolnego większą lub równą 1,25; za supresję – wartość ilorazu intensywności zaczerpnienia spotu badanego do spotu kontrolnego mniejszą lub równą 0,75; zmiany w ekspresji genów o mniejszej intensywności, nieistotne statystycznie wyszczególniono jako + ns (nadekspresja ns) lub - ns (supresja ns), natomiast brak zmian oznaczono jako bz; Nb piask – piaskowany Ti6Al7Nb, V piask – piaskowany Ti6Al4V.

FIG. 2. The number and type of changes in cell cycle gene expression in osteoblast cells cultured on the surfaces of tested biomaterials. Genes overexpression is determined for test to control spot volume ratio greater than or equal to 1.25, the suppression – for test to control spot volume ratio less than or equal to 0.75, changes in gene expression of a lower intensity, not statistically significant are listed as + ns (ns overexpression) or - ns (ns suppression), whereas no changes were determined as bz; Nb piask - sandblasted Ti6Al7Nb, V piask - sandblasted Ti6Al4V.

Na podstawie przeprowadzonych badań sformułowano następujące wnioski:

- Analiza transkryptomu osteoblastów hodowanych na powierzchniach badanych stopów tytanu oraz próbce referencyjnej wykazała liczne, znaczące zmiany w ekspresji genów w stosunku do hodowli kontrolnej.

- Kontakt osteoblastów z powierzchnią V pol, Nb piask i Nb pol spowodował włączenie trzech genów (100% nadekspresja). Są to dwa geny odpowiedzialne za punkty kontrolne i zatrzymanie cyklu komórkowego oraz gen odpowiedzialny za prawidłowy przebieg fazy G2 i przejścia fazy G2 w fazę M.

- Istotne zmiany w ekspresji dotyczą od 23 do 40 genów cyklu komórkowego, przy czym największą ilość zmian zaobserwowano dla polerowanego stopu Ti6Al4V, a najmniejszą - dla referencyjnej próbki stalowej (RYS.2.).

- Najczęstszym mechanizmem zmian w komórkach osteoblastów poddanych kontaktowi z badanymi sto-

Then the molecules of RNA were amplified and biotin-labeled with the use of MessageAmp™ II-Biotin Enhanced Kit (Ambion). Microarray membranes subjected to a previous hybridization were incubated with the RNA samples for 12h at 60°C, then blocked with blocking buffer and incubated with a complex of streptavidin-alkaline phosphatase. Addition of CDP-Star allowed to obtain an image of transcriptome on X-ray film by the chemiluminescence method. For densitometric analysis of microarrays ImageQuant TL program (GE Healthcare) was used. Microarrays images for polished Ti6Al4V and Ti6Al7Nb alloys are shown in FIG.1

Based on our study the following conclusions are made:

- Analysis of the transcriptome of osteoblasts cultured on polished and sandblasted surfaces of titanium alloys and the reference sample indicated numerous, significant changes in gene expression compared to control culture.

- Contact of osteoblasts with the surface of V pol, Nb pol and Nb piask resulted in the turning on of three genes (100% overexpression). These are two genes responsible for the cell cycle checkpoints and cell cycle arrest and one gene responsible for G2 phase and G2/M phase transition.

- Significant changes in gene expression include 23 to 40 genes of the cell cycle, with the largest number of changes observed for

polished Ti6Al4V alloy, and the lowest - for the reference sample (FIG.2).

- The most common mechanism of changes in osteoblastic cells cultured in the presence of examined titanium alloys, regardless of their surface modification, is overexpression (the increase of gene expression).

pami tytanu, niezależnie od ich modyfikacji powierzchniowej, jest nadekspresja (wzrost ekspresji genów).

Podziękowania

Badania finansowane w ramach projektu „DIAHAP: New carbon-hydroxyapatite nanocomposites on metallic bases applied in medicine”.

METODA WYTWARZANIA KOMPOZYTÓW METALICZNO-CERAMICZNYCH Ti+HAp I JEJ WPŁYW NA WŁASNOŚCI STRUKTURALNE

MAGDALENA KLIMAS*, AGATA DUDEK

POLITECHNIKA CZĘSTOCHOWSKA,
WYDZIAŁ INŻYNIERII PROCESOWEJ MATERIAŁOWEJ I FIZYKI STOSOWANEJ,
INSTYTUT INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ,
AL.ARMII KRAJOWEJ 19, 42-200 CZĘSTOCHOWA, POLSKA
*MAILTO: MAGDAKLIMAS@WIP.PCZ.PL

Streszczenie

W artykule przedstawiono wpływ metody wytwarzania kompozytu metaliczno-ceramicznego Ti+HAp na jego własności strukturalne. Badania zostały wykonane na próbkach o osnowie tytanu zawierających od 20 do 50% HAp uzyskanych metodą metalurgii proszków, spiekanych w próżni o wartości 10^{-4} Pa oraz atmosferze argonu. Podczas badań dokonano analizy mikrostrukturalnej otrzymanych próbek, określono skład fazowy występujący w badanym materiale, oznaczono gęstość pozorną kompozytów przed i po spiekaniu. Dodatkowo wyznaczono zmianę liniową i objętościową, jaka towarzyszyła kompozytom.

Słowa kluczowe: kompozyty, tytan, hydroksyapatyt, metalurgia proszków

[Inżynieria Biomateriałów, 116-117, (2012), 48-51]

Wprowadzenie

Tytan posiadając dobre własności mechanicznych, wysoką odporność korozyjną oraz najlepszą wśród biomateriałów obojętność biologiczną, jest stosowany w różnych dziedzinach medycyny [1,2]. Stosowanie tytanu ogranicza jednak zjawisko metalozji, jak również niska odporność na ścieranie [3,4]. Pomocne w tym przypadku może być wytworzenie kompozytów Ti+HAp, łączących zalety materiałów metalicznych, uzupełnianych unikalnymi własnościami ma-

Acknowledgements

This study was financially supported by „DIAHAP: New carbon-hydroxyapatite nanocomposites on metallic bases applied in medicine”.

METHOD OF OBTAINING METALLIC-CERAMIC COMPOSITES OF Ti + HAp AND ITS EFFECT ON STRUCTURAL PROPERTIES

MAGDALENA KLIMAS*, AGATA DUDEK

CZĘSTOCHOWA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY
THE FACULTY OF MATERIALS PROCESSING TECHNOLOGY AND APPLIED PHYSICS, INSTITUTE OF MATERIALS SCIENCE,
19 ARMII KRAJOWEJ AVE., 42-200 CZĘSTOCHOWA, POLAND
*MAILTO: MAGDAKLIMAS@WIP.PCZ.PL

Abstract

The paper presents the effect of a method of obtaining a metallic-ceramic composite Ti+HAp on its structural properties. The examinations were carried out on the samples with titanium matrix which contained from 20 to 50% of HAp obtained by means of powder metallurgy, sintered in vacuum with pressure of 10^{-4} Pa and in argon atmosphere. The microstructural analysis of the obtained samples was carried out and phase composition was determined for the materials studied. Furthermore, the authors determined bulk density of composites before and after sintering as well as linear and volumetric changes observed for the composites.

Keywords: composites, titanium, hydroxyapatite, powder metallurgy

[Engineering of Biomaterials, 116-117, (2012), 48-51]

Introduction

Titanium, famous for its excellent mechanical properties, high resistance to corrosion and best biological compatibility among biomaterials, has been used in different areas of medical applications [1,2]. The use of titanium, however, is limited by the phenomenon of metallosis and exhibits low resistance to wear [3, 4]. In such cases, obtaining composites of Ti+HAp that combine the advantages of metallic ma-