

OCENA STOPNIA PROLIFERACJI KOMÓREK OSTEOBLASTO-PODOBNYCH W KONTAKCIE Z POWIERZCHNIAMI STOPU TYTANU PO PIASKOWANIU DO RÓŻNEGO STOPNIA CHROPOWATOŚCI

DOROTA BOCIAGA*, ANNA OLEJNIK, KRZYSZTOF JASTRZĘBSKI, ANNA SOBCZYK-GUZENDA, JUSTYNA PARADOWSKA

POLITECHNIKA ŁÓDZKA,
INSTYTUT INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ
UL. STEFANOWSKIEGO 1/15, 90-924 ŁÓDŹ
*E-MAIL: DOROTA.BOCIAGA@P.LODZ.PL

Streszczenie

Tytan i jego stopy są jednymi z najpopularniejszych biomateriałów metalicznych stosowanych w dzisiejszej implantologii. Mimo licznych zalet tych materiałów, wykonane z nich wszczepy często poddaje się dodatkowej obróbce powierzchni, której celem jest polepszenie integracji implantu z otaczającymi go tkankami. Spośród wielu dostępnych technik, jedną z najczęściej wykorzystywanych komercyjnie jest stosunkowo tania i szybka metoda piaskowania, polegająca na wystawianiu danego przedmiotu na kontakt ze strumieniem przyspieszonych cząstek materiału ściernego. Celem tej pracy była analiza wpływu piaskowania ścierniwem o różnej średnicy ziaren na właściwości obrabianej powierzchni elementów na bazie dwóch popularnych stopów tytanu: Ti-6Al-4V i Ti-6Al-7Nb. W celu scharakteryzowania uzyskanych powierzchni przeprowadzono badania ich topografii, składu chemicznego, chropowatości i zwilżalności. Ponadto, aby sprawdzić potencjalną reakcję organizmu na obecność obrobionych w ten sposób elementów dokonano oceny stopnia proliferacji ludzkich komórek kościotwórczych hodowanych w bezpośrednim kontakcie z przygotowanymi powierzchniami. Otrzymane wyniki wykazały wyraźną zależność pomiędzy stopniem chropowatości i składem chemicznym piaskowanych elementów, a zastosowanym do obróbki rodzajem medium ściernego. Badanie zachowania komórek będących w kontakcie z modyfikowanymi próbkami wykazało obniżoną skłonność osteoblastów do przylegania i namnażania na najbardziej chropowatych powierzchniach.

Słowa kluczowe: piaskowanie, osteoblasty, Ti-6Al-4V, Ti-6Al-7Nb, obróbka powierzchniowa

[*Inżynieria Biomateriałów 134 (2016) 8-17*]

Wprowadzenie

Tytan i jego stopy są materiałami szeroko rozpoznanymi w zastosowaniach biomedycznych, gdzie przede wszystkim służą jako elementy zastępujące zniszczone fragmenty układu kostnego. Popularność tych materiałów wynika głównie z niezwykle korzystnej kombinacji ich cech wytrzymałościowych i korozyjnych oraz, co bardzo istotne w przypadku biomateriałów, dużej biogodności. Przez lata stop Ti-6Al-4V był jednym z najczęściej stosowanych w implantologii stopów tytanu.

EVALUATION OF PROLIFERATION RATE OF OSTEOBLAST-LIKE CELLS IN CONTACT WITH TITANIUM ALLOY SURFACES SANDBLASTED TO DIFFERENT ROUGHNESS LEVEL

DOROTA BOCIAGA*, ANNA OLEJNIK, KRZYSZTOF JASTRZĘBSKI, ANNA SOBCZYK-GUZENDA, JUSTYNA PARADOWSKA

INSTITUTE OF MATERIALS SCIENCE AND TECHNOLOGY,
LODZ UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,
STEFANOWSKIEGO 1/15, 90-924 LODZ, POLAND
*E-MAIL: DOROTA.BOCIAGA@P.LODZ.PL

Abstract

Titanium and its alloys are very popular metallic biomaterials used for medical implants production. Despite numerous advantages of the bulk material, such implants are very often subjected to additional surface treatment in order to improve their integration within the body tissues. Besides many other available techniques, one of the most frequently used in the commercial sector is a fast and economically profitable process of abrasive blasting. It is a method in which a stream of accelerated particles collides with the implant surface what causes changes in the material properties. The following paper presents differences resulting from sandblasting of Ti-6Al-4V and Ti-6Al-7Nb specimens with blasting particles varying in size. In order to characterize the outcome of such the treatment, investigations of surface topography, chemical composition, roughness, and wettability were conducted. Finally, the behaviour of the osteoblast-like cells adhered to the sandblasted Ti-6Al-4V and Ti-6Al-7Nb surfaces was assessed in order to evaluate potential body response towards the aforementioned materials. The results suggest a strong correlation between surface roughness, its chemistry and the type of blasting medium applied. Evaluation of the cell culture revealed a rapid decrease in cell proliferation rate onto the roughest surfaces.

Keywords: sandblasting, osteoblasts, Ti-6Al-4V, Ti-6Al-7Nb, surface treatment

[*Engineering of Biomaterials 134 (2016) 8-17*]

Introduction

Titanium and its alloys are widely applied in implant devices where they help to replace failed bone tissue. The usability of those materials is mainly due to their favourable properties, such as biocompatibility, high corrosion resistance and mechanical characteristics. For a long time, Ti-6Al-4V biomaterials have been the most commonly used titanium alloys in medicine. However, as they appear to cause a possible toxic effect resulting from vanadium release, for the permanent implant applications vanadium-free alloys like Ti-6Al-7Nb are being introduced to the market now [1].

Mając jednak na uwadze jego potencjalne toksyczne działania wywołane uwalnianiem wanadu do organizmu, coraz częściej – zwłaszcza w zastosowaniach długoterminowych – proponuje się użycie stopów bezwanadowych, na przykład stopu Ti-6Al-7Nb [1].

Uwzględniając fakt, iż każdy wszczep kontaktuje się z otaczającymi go w ciele pacjenta tkankami i płynami fizjologicznymi poprzez swoją powierzchnię zauważono, że właściwości materiału litego, z którego element jest wykonany nie są jedynymi czynnikami wpływającymi na reakcje zachodzące na granicy implant-środowisko zewnętrzne. Okazuje się bowiem, że równie istotna jest charakterystyka samej powierzchni, jej właściwości fizyczne, chemiczne i mechaniczne oraz topografia. Spośród wielu prowadzonych w tej dziedzinie badań, duża część prac skupia się na wpływie chropowatości na inne właściwości powierzchni, między innymi na zmiany w składzie chemicznym, zwilżalność i zdolność do uwalniania jonów. Na ogół przyjmuje się, że powierzchnie bardziej chropowate stymulują wzrost potencjału biomechanicznego kontaktu na granicy implantu i kości. Wszczyepy o większej chropowatości wykazują większe rozwinięcie powierzchni, co powoduje, że mogą być lepiej i szybciej zakotwiczone w tkance kostnej, skracając tym samym czas potrzebny do pełnego zagojenia się operowanego miejsca [2]. Wiele prowadzonych dotychczas badań *in vivo* dowiodło, że zdolność implantu do integracji z otaczającymi go tkankami jest pozytywnie skorelowana ze wzrostem chropowatości jego powierzchni [3-5]. Rozwinięcie powierzchni właściwej implantów wspomaga również adsorpcję białek zapoczątkowujących proces osteointegracji [6]. Wykazano także, że chropowate wszczyepy na bazie tytanu mają zdolność kontrolowania zachowania osteoblastów (komórek formujących kość), wpływając na ich adhezję do powierzchni implantu oraz dalszą aktywność enzymatyczną [7,8].

Znalezienie sposobu na szybkie i pełne zintegrowanie implantu z otaczającym go środowiskiem jest kwestią kluczową dla ograniczenia czasu, który musi upłynąć od operacji do momentu, kiedy wszczep staje się w pełni funkcjonalny. Uwzględniając jak duże znaczenie mają właściwości powierzchniowe implantu, wiele metod modyfikacji powierzchni dostępnych od lat w różnych sektorach przemysłu zostało dostosowanych do specyficznych potrzeb inżynierii biomedycznej. Przykładem takiej obróbki jest właśnie piaskowanie. Proces ten opiera się na bombardowaniu obrabianego elementu strumieniem twardych cząstek o dużej prędkości, które uderzają w powierzchnię i usuwają część znajdującego się tam materiału, zmieniając tym samym jej właściwości. W roli ścierniwa używa się zazwyczaj piasku z węglika krzemu (SiC), szklanych kulek, suchego lodu, śrutu metalowego, cząstek tlenku glinu (Al_2O_3), krzemionki (SiO_2) bądź innych ścierniw proszkowych [9]. Z punktu widzenia aplikacji biomedycznych, najważniejszym zastosowaniem procesu piaskowania wydaje się być możliwość zwiększania stopnia chropowatości elementów poddawanych obróbce. Ponadto, technika ta dobrze sprawdza się też w oczyszczaniu powierzchni, a także przyczynia się do powierzchniowego umocnienia materiału, wprowadzając pożądane naprężenia ściskające na skutek lokalnego plastycznego odkształcenia materiału [9, 10].

Powierzchnie poddawane piaskowaniu wykazują wyższą energię powierzchniową świadczącą o większej aktywności chemicznej i fizycznej otrzymanej warstwy wierzchniej [10]. Ze względu na swoje liczne zalety, w tym szybkość, łatwość obsługi i cenę, piaskowanie jest powszechnie używane do czyszczenia i nadawania chropowatości implantom dostępnym komercyjnie, na przykład implantom stomatologicznym, częściom rozruszników serca i trzpieniom endoprotez stawu biodrowego. Metoda ta niesie jednak ze sobą niebezpieczeństwo odkładania się pozostałości procesowych.

Owing to the fact that every implanted medical device is in direct contact with surrounding body tissues and physiological fluids, it was noticed that the properties of the bulk material are not the only factor influencing the implant-body interactions. Characteristics of the implanted element surface, its chemical, physical and mechanical properties are a crucial aspect as well. As a result, a lot of studies focus on surface roughness and its consequential changes in surface chemistry, wettability, ion release, etc. It is generally expected that the rougher surfaces promote faster and more successful regeneration. The increased roughness level results in higher specific surface area, causing the implant to be better anchored in the bony tissue [2]. Many *in vivo* studies have already proved that integration of the implants is positively correlated with rising implant surface roughness [3-5] and that an increase in the effective surface area of the titanium implants enhances the biomechanical potential of implant-bone interfaces, improving adsorption of proteins to the implant's surface [6]. The rough titanium-based surfaces also appeared to control behaviour of the osteoblasts (bone forming cells) by influencing their adhesion to the surface and further enzymatic activity [7,8].

Finding a proper way to effectively improve integration of the implant with body tissues is crucial for shortening the time interval between the surgery and a moment when the device becomes fully usable. Concerning the importance of the surface properties, a plethora of various surface treatments commonly accessible in different branches of the industry have been rearranged to serve in the biomedical sector. One of such a method is the process of abrasive blasting traditionally called sandblasting. This technique is based on the bombardment of the element to be modified by hard particles of high velocity and as a result, part of the material is excluded from material surface. For hard solid material forced across the surface one may use carborundum (SiC) grits, glass beads, dry ice, metal pellets, alumina (Al_2O_3), silica (SiO_2) and other powdered abrasives [9]. From the biomedical point of view, one of the most relevant functions of sandblasting is its ability to roughen the modified elements. The process may be also applied in order to remove surface contamination. Finally, sandblasting could be profitable from the mechanical point of view as it produces beneficial surface compressive residual stresses by introducing local plastic deformation of the treated material [9, 10].

The surfaces finished with abrasive blasting exhibit higher surface energy, indicating higher surface chemical and physical activities [10]. Due to their numerous benefits, mainly short processing time and relatively small costs, the blasting techniques are commonly used for cleaning and surface roughening of commercial implants like dental implants, pacemakers and femoral stems. It must be noted however that medium particles used for bombardment of the surface are likely to become embedded in the material, especially in plastic one like titanium, and then to be released to the physiological fluids in the body [11]. In order to reduce possible effect of ion release and at the same time to ensure sufficient surface roughness, the biomedical devices are sandblasted with particular size of the abrasive medium, mostly with particles between 25 and 250 μm [12]. Therefore, the main objective of the following paper is to verify the influence of the blasting particles diameter within the abovementioned size range on the characteristics of the sandblasted surfaces and potential biological response of the host organism was evaluated within this study.

Jest to szczególnie niebezpieczne w przypadku piaskowania miękkich materiałów, na przykład tytanu, gdzie cząstki ścierniwa mogą łatwo wbudować się w strukturę powierzchni i być z niej uwalniane z czasem, kiedy implant znajdzie się w otoczeniu tkanek i płynów fizjologicznych pacjenta [11]. W celu ograniczenia tego zjawiska, ale przy jednoczesnym zachowaniu odpowiedniego stopnia chropowatości powierzchni, zalecane jest, by implanty medyczne piaskować ścierniwem, którego rozmiar mieści się w określonym przedziale, najczęściej od 25 do 250 μm [12]. Celem tej pracy jest sprawdzenie, jak rozmiar cząstek ze wspomnianej wyżej zakresu wpływa na charakterystykę piaskowanej powierzchni i potencjalną odpowiedź organizmu mającego kontakt z modyfikowanym w ten sposób implantem.

Materiały i metody

Przygotowanie próbek

Do badania użyto dwóch komercyjnie dostępnych stopów tytanu: Ti-6Al-4V i Ti-6Al-7Nb (Bibus Metals, Polska), spełniających odpowiednio normy ASTM B348 i ASTM F1295. Cylindryczne próbki (16 mm średnicy, 6 lub 8 mm grubości) stopów poddano szlifowaniu papierami ściernymi z ziarnami SiC o różnej gradacji i polerowaniu przy pomocy koloidalnej zawiesiny SiO_2 (Struers). Próbki każdego ze stopów podzielono na cztery zestawy, a każdy z nich poddano piaskowaniu przy pomocy cząstek tlenku glinu o różnej wielkości (KOS, Polska). Zakres rozmiarów użytego ścierniwa prezentuje TABELA 1. Proces piaskowania wykonano w piaskarce ALOX 2001 (EFFEGI BREGA, Włochy) wykorzystując strumień cząstek ścierniwa o ciśnieniu równym 4 bary. Czas modyfikacji każdej z próbek wynosił 10 minut. Jako próbki kontrolne wykorzystano polerowane mechanicznie krążki Ti-6Al-4V i Ti-6Al-7Nb. Wszystkie próbki oczyszczono w acetonie (5 min), alkoholu (10 min) i wodzie destylowanej (5 min) z wykorzystaniem myjki ultradźwiękowej i osuszono przy użyciu sprężonego powietrza. Przed przeprowadzeniem badań próbki zostały poddane sterylizacji parowej w temperaturze 127°C.

TABELA 2. Oznaczenia badanych próbek.

TABLE 2. Samples abbreviations used in the study.

	próbka kontrolna (polerowana) reference sample (mechanically polished)	komplet piaskowany I blasted series I	komplet piaskowany II blasted series II	komplet piaskowany III blasted series III	komplet piaskowany IV blasted series IV
Ti-6Al-4V	Ti+V/mp	Ti+V/s.200	Ti+V/s.115	Ti+V/s.60	Ti+V/s.45
Ti-6Al-7Nb	Ti+Nb/mp	Ti+Nb/s.200	Ti+Nb/s.115	Ti+Nb/s.60	Ti+Nb/s.45

Zgodnie z rodzajem użytego biomateriału i rozmiarem cząstek ścierniwa, seriom próbek nadano odpowiednie oznaczenia. Odwołania do poszczególnych przypadków będą w kolejnych sekcjach czynione w sposób zaprezentowany w TABELI 2. Przypisane seriom numery (s.200, s.115, s.60, s.45) odpowiadają uśrednionemu rozmiarowi cząstek z wymienionych wcześniej w TABELI 1 zakresów wielkości.

Analiza powierzchni

Ocenę morfologii i składu chemicznego piaskowanych powierzchni dokonano z użyciem skaningowego mikroskopu elektronowego SEM JSM-6610LV (JEOL, USA) zaopatrzonego w przystawkę X-MAX 80 EDS (Oxford Instruments, UK). Parametry chropowatości wyliczono na podstawie pomiarów profilometrem (JENOPTIK, Niemcy) na odcinku o długości 4,8 mm. Wykonano również badanie zwilżalności modyfikowanych powierzchni oceniając geometrię umieszczonych na nich kropli wody (FM40 Easy Drop, KRÜSS, Niemcy). Wszystkie pomiary wykonane były na trzech różnych próbkach tego samego typu.

Materials and Methods

Substrate preparation

The study was conducted on two commercially available titanium-based alloys Ti-6Al-4V and Ti-6Al-7Nb (Bibus Metals, Poland) that conformed ASTM B348 and ASTM F1295 standard, respectively. Disks of 16 mm in diameter, 6 to 8 mm thick of both alloys were initially ground with silicon carbide (SiC) papers and polished with colloidal silica (SiO_2) suspension (Struers). Concerning the metal alloy used, the samples were divided into four subgroups and subjected to sandblasting with Al_2O_3 particles (KOS, Poland) of different sizes (TABLE 1). The process was carried out in an ALOX 2001 sandblaster (EFFEGI BREGA, Italy) under pressure of 4 Bars for about 10 min for each sample. As the reference samples, specimens of mechanically polished Ti-6Al-4V and Ti-6Al-7Nb were used. All the prepared specimens were ultrasonically cleaned in acetone (5 min), alcohol (10 min), distilled water (5 min) and afterwards dried with the compressed stream of air. Before further examination, all samples were steam sterilized at 127°C.

TABELA 1. Rozmiary cząstek użytego ścierniwa.
TABLE 1. Size ranges of the blasting medium.

komplet series	rozmiar cząstek Al_2O_3 size of Al_2O_3 particles
komplet I / series I	180-212 μm
komplet I / series II	106-125 μm
komplet I / series III	53-75 μm
komplet I / series IV	44-46 μm

The samples were given abbreviations according to the used alloy and size of the abrasive particles, as presented in TABLE 2. The assigned numbers (s.200, s.115, s.60, s.45) indicate the average micrometre size of the abrasive particles taken from the size ranges presented in TABLE 1.

Surface analysis

The morphology and chemical composition of the sandblasted samples were investigated with the use of a scanning electron microscope SEM JSM-6610LV (JEOL, USA) equipped with X-MAX 80 EDS analyzer (Oxford Instruments, UK). For the roughness evaluation, profilometer (JENOPTIK, Germany) measurements with the sampling length equal to 4.8 mm were applied. Additionally, surface wettability was assessed with the use of sessile drop technique and FM40 Easy Drop system (KRÜSS, Germany). All the measurements were carried out on three different specimens of the same kind.

Hodowla komórkowa

Właściwości biologiczne rozpatrywanych biomateriałów oceniono w teście live/dead (Live/Dead Viability/Cytotoxicity Kit, Molecular Probes), za pomocą którego określono cytotoksyczność piaskowanych powierzchni oraz poziom proliferacji ludzkich komórek osteoblastopodobnych Saos-2 hodowanych z nimi w bezpośrednim kontakcie. Do badania każdego kompletu użyto dwóch osobnych próbek danego typu, na które naniesiono zawiesinę komórek o początkowej gęstości wysiania 30 000 komórek/cm². Jako próbki kontrolne dla tego doświadczenia użyto komórki nie poddane kontaktowi z żadnym biomateriałem metalicznym oraz komórki kontaktujące się z próbką polerowanej stali austenitycznej AISI 316L. Wyniki testu zebrano po 48 godzinach inkubacji. Zaadherowane do powierzchni próbek komórki oglądano przy użyciu metalurgiczno-biologicznego mikroskopu fluorescencyjnego (Olympus GX 71) przy 10-krotnym powiększeniu. W celu rozróżnienia komórek żywych i martwych użyto dwóch barwników fluorescencyjnych, tj. kalceiny i bromku etydyny. Wyniki liczbowe prezentowane w kolejnych sekcjach przedstawiają średnią liczbę komórek zaobserwowanych w polu widzenia dla pięciu przypadkowych obszarów na każdej z próbek, po odrzuceniu dwóch skrajnych wyników z otrzymanej puli danych.

Analiza statystyczna

Do oceny istotności statystycznej badanych wyników testu barwienia live/dead użyto jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA. Porównano stopień proliferacji komórek dla użytego tytanowego podłoża stopowego w każdym z rozpatrywanych przypadków obróbki, a także różnice wynikające z zastosowania różnych metod traktowania powierzchni w obrębie tego samego biomateriału. Za wartość graniczną poziomu istotności przyjęto $p < 0,05$.

Wyniki i dyskusja

Morfologię analizowanych powierzchni przedstawiają mikrografie SEM na RYS. 1. Badania nie ujawniły znaczących różnic wynikających z rodzaju piaskowanego podłoża, tj. stopów Ti-6Al-4V i Ti-6Al-7Nb (RYS. 1 a-h), jednakże zaobserwowano zmianę struktury w zależności od wielkości cząstek ścierniwa, którym piaskowane były poszczególne próbki. Wraz z rosnącym rozmiarem cząstek ścierniwa rosła chropowatość obrabianych powierzchni. Chropowatość wszystkich piaskowanych próbek była znacznie wyższa od próbek kontrolnych (RYS. 1 i,j).

Analiza EDS badanych powierzchni dowiodła, że piaskowanie może zmieniać skład chemiczny traktowanych tą metodą powierzchni. Jak odwzorowane w wielkości pików dla glinu (Al) oraz tlenu (O) w przykładowych widmach EDS badanych próbek (RYS. 2), piaskowane powierzchnie charakteryzowały się zwiększoną zawartością tych dwóch pierwiastków w porównaniu do próbek polerowanych mechanicznie. Ponadto, prócz zmienionego składu podstawowych elementów stopowych, każda z piaskowanych próbek zawierała na swojej powierzchni dodatkowy pierwiastek – sód (Na) lub krzem (Si). Uwzględniając fakt, że analiza wykonana była przy zachowaniu tej samej odległości roboczej dla każdej z próbek, zaobserwowane zjawisko należy tłumaczyć faktem, że cząstki użytego w piaskowaniu ścierniwa wbudowały się w strukturę piaskowanej powierzchni, stając się tym samym pozostałością poprocesową.

Cell culture

Cell proliferation and surface cytotoxicity of the prepared biomaterials were assessed with the use of live/dead test (Live/Dead Viability/Cytotoxicity Kit, Molecular Probes) on osteoblast-like Saos-2 cells cultured over the prepared surfaces with the initial seeding density equal to 30 000 cells/cm². The experiment was conducted on two different samples of the same kind. Cells not exposed to the contact with any metallic biomaterial as well as cells contacting with the mechanically polished austenitic stainless steel (AISI 316L) sample were used as the control sets. The proliferative activity of the cultured cells was determined after 48 h from the initial seeding. The observations were carried out with the use of a fluorescence microscope (Olympus GX 71, magnification $\times 10$) and fluorescent markers, namely calcein AM and ethidium bromide. The quantitative results presented in further sections comprise the average number of cells calculated from the images acquired in five different spots on each of the investigated specimens, without two extreme values excluded from the obtained data set.

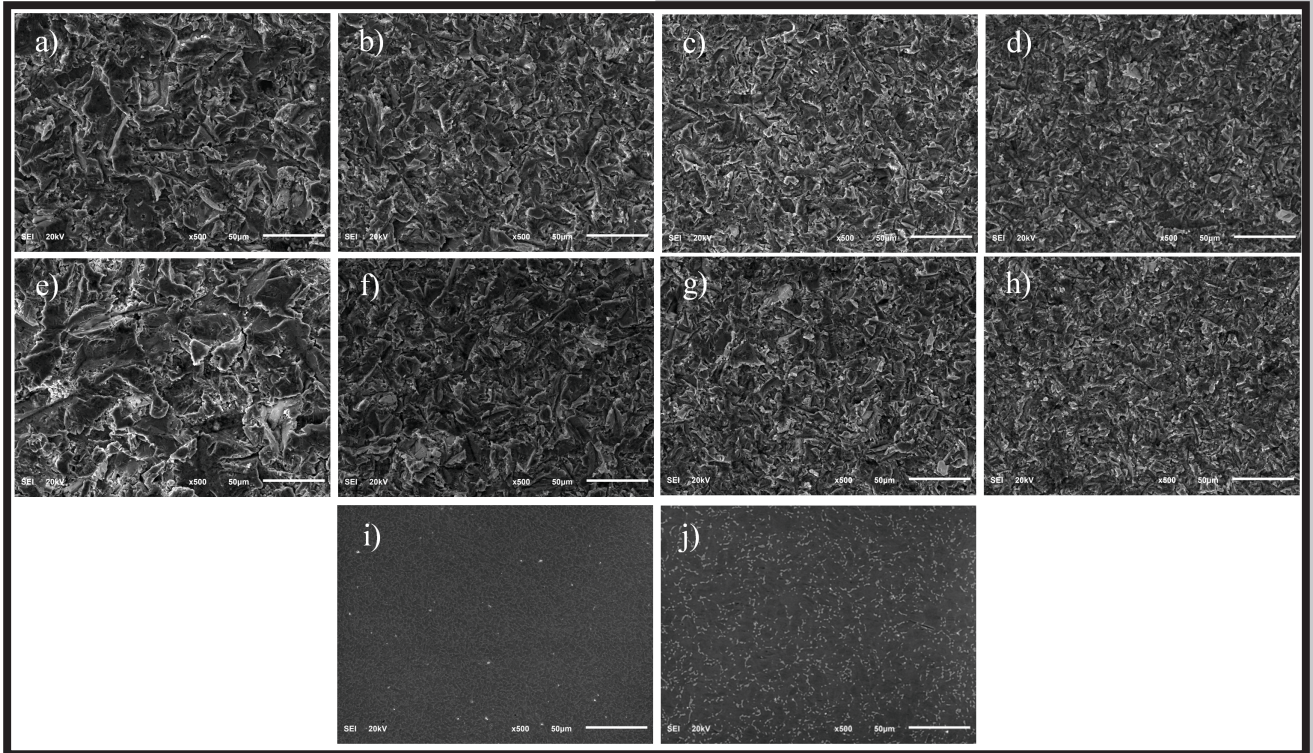
Statistical analysis

The statistical analysis of the results obtained in the live/dead test was carried out using one-way analysis of variance (ANOVA). One compared the proliferation level of cells due to the type of titanium alloy used as well as the differences resulting from the applied surface treatment for both materials. Results with $p < 0.05$ were considered to be statistically significant.

Results and Discussions

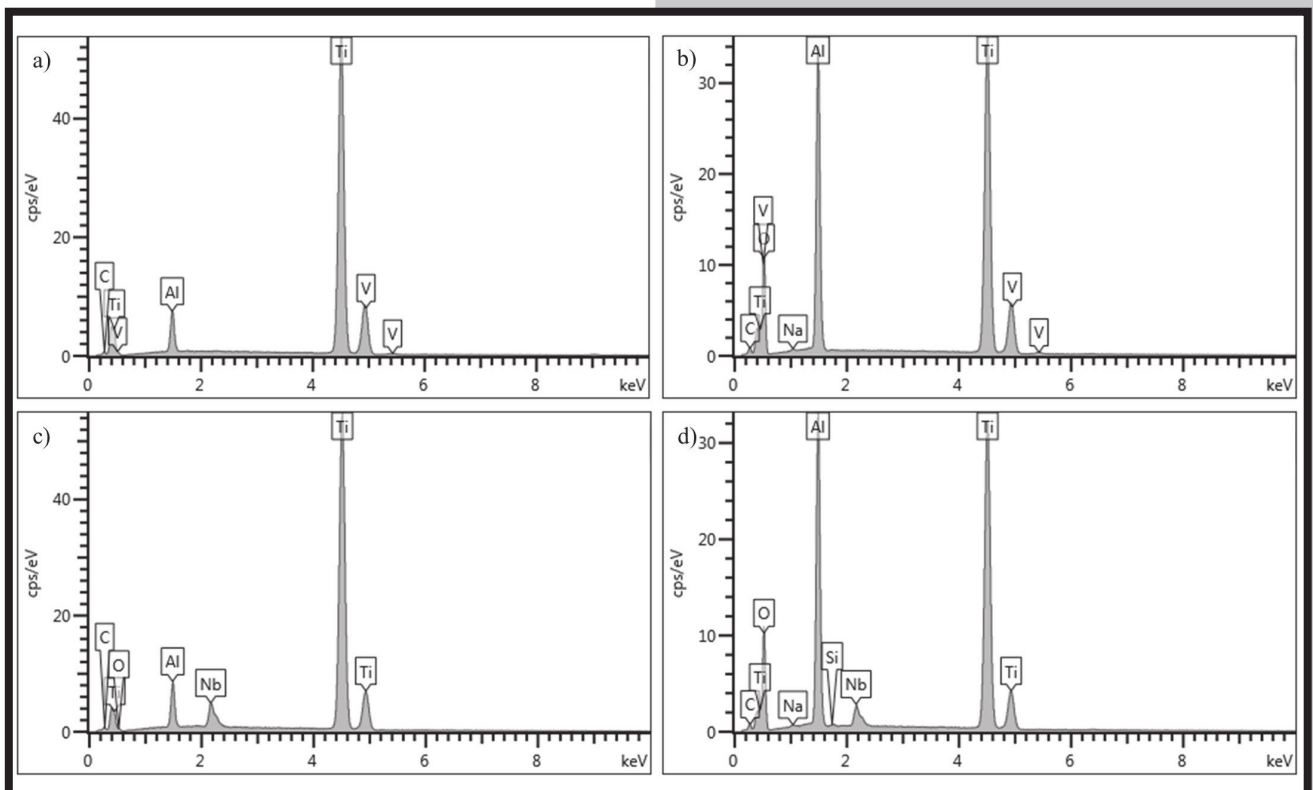
SEM investigation of the specimens did not reveal any significant discrepancies in the surface morphology of the sandblasted Ti-6Al-4V and Ti-6Al-7Nb samples (FIG. 1 a-h). However, changes in surface structure depending on the size of the applied blasting medium could be observed. Moreover, it could be noticed that with the increasing size of the particles, the roughness of the surface was higher as well. Simultaneously, the roughness of the sandblasted surfaces was significantly higher than for the reference mechanically polished samples (FIG. 1 i,j).

The results of the EDS analysis proved that the process of sandblasting may influence the chemical composition of the samples surface. As indicated by the higher peaks for aluminium (Al) and oxygen (O) in the presented EDS spectra (FIG. 2), the sandblasted surfaces appeared to contain increased contribution of those two elements in comparison to the mechanically polished samples. Apart from the changed ratio of the basic alloying elements, in all of the sandblasted cases some additional elements like sodium (Na) or silicone (Si) were present as well. According to the fact that all the measurements were taken with the same working distance for each specimen, such a phenomenon is expected to be a direct result of sandblasting. The abrasive particles could be embedded into the surface material during the treatment.



RYS. 1. Mikrografie SEM przygotowanych powierzchni: Ti+V/s.200 (a), Ti+V/s.115 (b), Ti+V/s.60 (c), Ti+V/s.45 (d), Ti+Nb/200 (e), Ti+Nb/s.115 (f), Ti+Nb/s.60 (g), Ti+Nb/s.45 (h), Ti+V/mp (i), Ti+Nb/mp (j).

FIG. 1. SEM micrographs of the prepared surfaces: Ti+V/s.200 (a), Ti+V/s.115 (b), Ti+V/s.60 (c), Ti+V/s.45 (d), Ti+Nb/200 (e), Ti+Nb/s.115 (f), Ti+Nb/s.60 (g), Ti+Nb/s.45 (h), Ti+V/mp (i), Ti+Nb/mp (j).

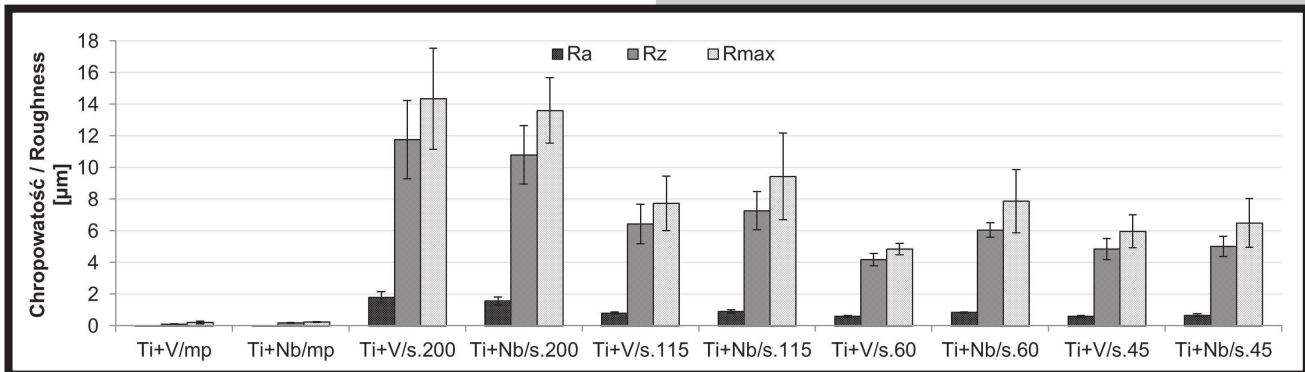


RYS. 2. Widma EDS dla próbek Ti-6Al-4V i Ti-6Al-7Nb polerowanych mechanicznie (a, c) oraz piaskowanych (b, d).

FIG. 2. EDS spectra for mechanically polished (a, c) and sandblasted (b, d) Ti-6Al-4V and Ti-6Al-7Nb specimens.

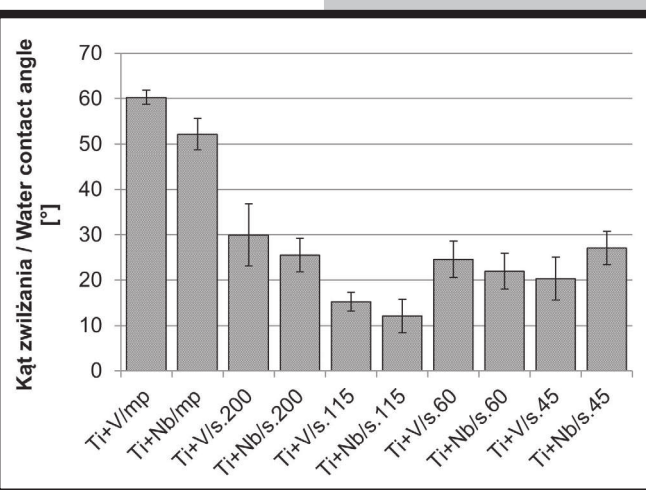
Kolejną z określonych właściwości przygotowanych powierzchni była ich chropowatość. W wyniku badania profilometrem wyznaczono trzy parametry: średnie arytmetyczne odchylenie profilu chropowatości na długości odcinka pomiarowego (Ra), wysokość chropowatości według pięciu najwyższej i pięciu najniższej położonych punktów profilu (Rz) oraz maksymalną wysokość chropowatości ($Rmax$). Wyniki pomiarów zaprezentowane na RYS. 3 potwierdzają obserwację SEM – najbardziej chropowate powierzchnie to te, które poddano działaniu ścierniwa o największej średnicy ziarna. Ponadto próbki piaskowane coraz drobniejszym piaskiem stają się gładziej, osiągając niższe wartości średniego arytmetycznego odchylenia profilu chropowatości. Jak można również zaobserwować, w większości przypadków (serie próbek *s.115*, *s.60*, *s.45*), powierzchnie na bazie stopu z niobem miały najniższą chropowatość.

Concerning the examination of further surface characteristics, surface roughness of the prepared samples was evaluated using three distinctive parameters: arithmetical mean deviation of the roughness profile (Ra), ten point average roughness (Rz), and maximum roughness height within a sampling length ($Rmax$). The results presented in FIG. 3 confirmed the SEM observations. The roughest surfaces in terms of the highest Ra parameters were obtained by treating the samples with the biggest blasting particles. The roughness decreased with decreasing blasting particle size. It may be also noticed that for the majority of the blasting sample series (*s.115*, *s.60*, *s.45*), the surfaces of the niobium-containing alloy were rougher than the surfaces of the vanadium-containing alloy. The mechanically polished samples were characterized by very low roughness values.



RYS. 3. Chropowatość badanych powierzchni.
FIG. 3. Roughness of the examined surfaces.

Ocenił pod kątem chropowatości i składu chemicznego próbki zostały poddane badaniu zwilżalności przez wodę metodą siedzącej kropli. Otrzymane wyniki (RYS. 4) wskazują, że niezależnie od zastosowanej metody obróbki wszystkie powierzchnie były hydrofilowe, jako że wartość ich kąta zwilżania nie przekroczyła 90° . Jednakże, próbki piaskowane charakteryzowały się wyższą zwilżalnością w porównaniu do mechanicznie polerowanych próbek kontrolnych. Prócz stwierdzenia większej hydrofilowości w wyniku obróbki piaskowaniem, na podstawie otrzymanych wyników nie można określić żadnej relacji między rozmiarem cząstek użytego ścierniwa a wartością kąta zwilżania. Warto jednak zaznaczyć, że w większości badanych kompletów (z wyłączeniem serii *s.45*), zwilżalność próbek zależała od rodzaju użytego biomateriału i osiągnęła mniejsze wartości kąta w przypadku próbek ze stopu Ti-6Al-7Nb.

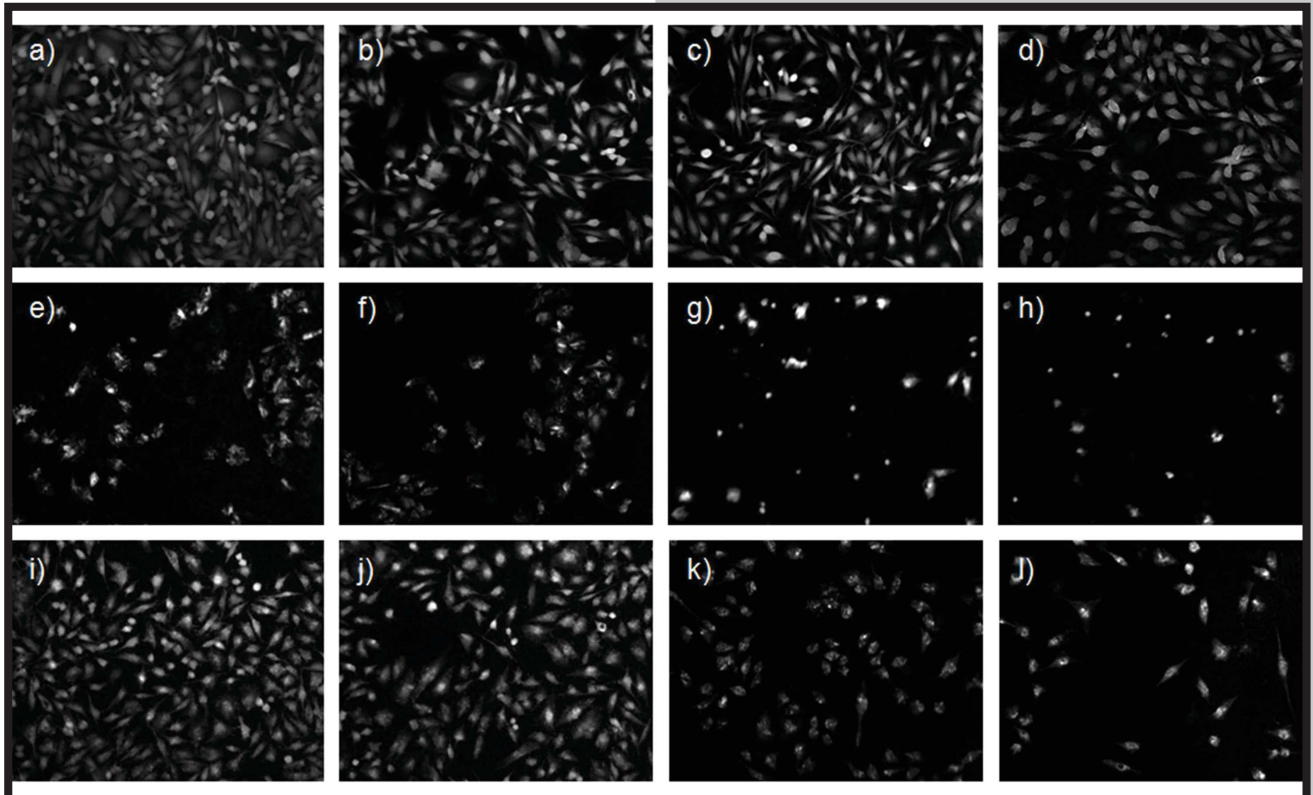


RYS. 4. Zwilżalność przygotowanych powierzchni.
FIG. 4. Water contact angle of the prepared surfaces.

Ostatnim z etapów badania właściwości przygotowanych powierzchni było określenie zachowania ludzkich komórek osteoblastopodobnych hodowanych z nimi w bezpośrednim kontakcie. Jakościową ocenę gęstości zasiedlenia i rozmieszczenia komórek na powierzchni badanych materiałów przedstawiają zdjęcia z mikroskopu fluorescencyjnego na RYS. 5.

The next surface property to be analysed was surface wettability. Sessile drop measurements revealed that all of the prepared surfaces were hydrophilic since water contact angle did not exceed 90° (FIG. 4). Moreover, the sandblasted samples were characterized by lower water contact angles than the mechanically polished reference samples. Even though no clear relation between size of the blasting medium particles and surface wettability was observed, one could note that in general (apart from *s.45* series), wettability of the niobium-containing alloy was higher than for the vanadium-containing counterpart.

In the final step, the behaviour of the osteoblast-like cells cultured in contact with the prepared surfaces was evaluated. FIG. 5 presents the fluorescence microscopic images showing density and distribution of the cells over the prepared surfaces. The control samples were characterized by high proliferation rate and evenly distributed cells of proper, spindle-like shape. Contrary to the aforementioned, the samples treated with big blasting particles of about 200 and 115 μm in diameter resulted not only in very low proliferation rate but also in different, abnormal shape of the cells.



RYS. 5. Ocena zachowania komórek osteoblastopodobnych po 48 godzinach hodowli: bez kontaktu z biomateriałem (a), stal austenityczna 316L (b), Ti+V/mp (c), Ti+Nb/mp (d), Ti+V/s.200 (e), Ti+Nb/s.200 (f), Ti+V/s.115 (g), Ti+Nb/s.115 (h), Ti+V/s.60 (i), Ti+Nb/s.60 (j), Ti+V/s.45 (k), Ti+Nb/s.45 (l).

FIG. 5. Osteoblasts-like cells' response after 48 hour of culture: Saos-2 control (a), 316L mechanically polished (b), Ti+V/mp (c), Ti+Nb/mp (d), Ti+V/s.200 (e), Ti+Nb/s.200 (f), Ti+V/s.115 (g), Ti+Nb/s.115 (h), Ti+V/s.60 (i), Ti+Nb/s.60 (j), Ti+V/s.45 (k), Ti+Nb/s.45 (l).

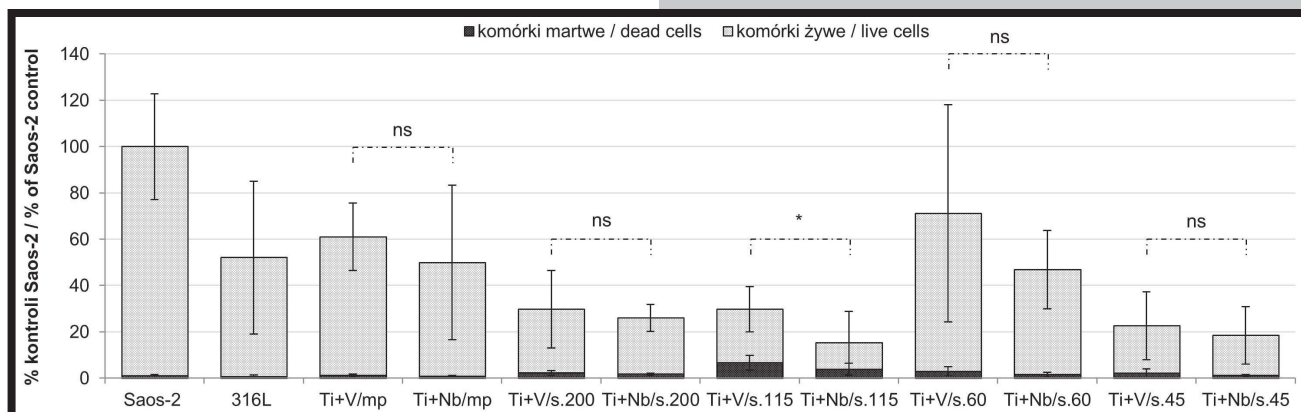
Komórki osiadłe na próbkach kontrolnych miały prawidłowy, wrzecionowaty kształt i zasiedlały powierzchnię w dużych ilościach, w sposób równomierny. Takich wyników nie osiągnięto w przypadku próbek piaskowanych dużymi cząstkami materiału ściernego. Na powierzchniach traktowanych cząstkami o wielkości około 200 i 115 μm zaobserwować można małą liczbę komórek, wszystkie o nienaturalnym kształcie. Podobne rezultaty uzyskano dla próbek piaskowanych najmniejszymi ziarnami piasku ($\sim 45 \mu\text{m}$), choć w tym przypadku komórki były mniej zdeformowane. Spośród przebadanych zestawów próbek piaskowanych najlepsze wyniki osiągnięto dla powierzchni modyfikowanych stosunkowo małymi cząstkami, których rozmiar wynosił około 60 μm średnicy. Przewaga kompletu s.60 była widoczna nie tylko w stopniu proliferacji i równomierności rozmieszczenia komórek na powierzchni próbki, ale także w ich kształcie, który był najbardziej zbliżony do zaobserwowanego w przypadku prób kontrolnych.

Ilościową ocenę barwienia live/dead pokazano na RYS. 6. Wykres przedstawia różnice w stopniu proliferacji komórek (wysokość każdej kolumny) oraz cytotoksyczność badanych powierzchni (odsetek martwych komórek). Otrzymane dane wskazują, że żaden z przebadanych kompletów nie osiągnął lepszych rezultatów od próbki kontrolnej, gdzie komórki nie były wystawione na kontakt z żadnym biomateriałem metalicznym. Próbki poddane piaskowaniu wykazały większą cytotoksyczność aniżeli próbki polerowane mechanicznie. Analiza wariancji ANOVA ujawniła różnice statystycznie dla stopnia proliferacji komórek na obu stopach w przypadku porównania próbek serii s.60 i s.115, a także serii s.45 w odniesieniu do próbek kontrolnych polerowanych mechanicznie oraz serii s.60.

Similar results, but with better cell shape, were obtained for the samples blasted with the smallest particles ($\sim 45 \mu\text{m}$). Among the sandblasted surfaces, the best biological response was obtained for the samples treated with relatively small blasting particles of about 60 μm in diameter. For the s.60 series high proliferation rate and proper cell morphology, similar to that obtained in the case of the control samples were observed.

The quantitative results of the live/dead test are given in FIG. 6. The graph outlines differences in cell proliferation rate (height of each particular bar) and surface cytotoxicity (ratio of dead cells). All examined samples were characterized by lower proliferation rate than the control sample which was not exposed to contact with any biomaterial. Additionally, higher surface cytotoxicity level was noted for all of the sandblasted surfaces in comparison to the mechanically polished samples. The ANOVA analysis of variance showed statistical significance in proliferation level difference for both alloys while comparing s.60 and s.115 series, as well as for series s.45 compared to mechanically polished control samples and series s.60.

The described analysis served also as the examination of the influence of applied biomaterial type on the biological response of the cells cultured on Ti-6Al-4V and Ti-6Al-7Nb specimens. The statistical analysis revealed that there were significant differences in proliferation level for samples sandblasted with particles of $\sim 115 \mu\text{m}$ according to the used material. The relation was marked in the graph in FIG. 6.



RYS. 6. Ocena stopnia proliferacji komórek oraz cytotoksyczności badanych powierzchni (ns - brak różnic statystycznie, * - różnice statystycznie).

FIG. 6. Cell proliferation and biomaterial surface cytotoxicity assessment (ns - no statistical significance, * - statistical significance).

W przeprowadzonym badaniu przeanalizowano także wpływ zastosowanego rodzaju biomateriału na odpowiedź biologiczną komórek hodowanych na powierzchniach Ti-6Al-4V oraz Ti-6Al-7Nb. Analiza statystyczna dowiodła, że dla próbek traktowanych piaskiem o średnicy ok. 115 μm , otrzymane różnice w stopniu proliferacji komórek były znaczące, co oznaczono na wykresie na RYS. 6.

Przeprowadzone badania pozwalają zauważyć, że piaskowanie biomateriałów wpływa na ich właściwości, co jest odzwierciedlane w zachowaniu komórek będących z nimi w kontakcie. W wielu opublikowanych do tej pory artykułach opisano zalecenia co do wielkości cząstek, którymi powinno się piaskować materiały do zastosowań biomedycznych. Niektóre ze źródeł mówią o stosunkowo małym zakresie 25-75 μm średnicy [12]. Głównym celem dostosowywania cząstek piaskujących jest znalezienie ich optymalnych rozmiarów. Oczekuje się, by były one wystarczająco duże aby zwiększyć chropowatość i rozwinięcie powierzchni potrzebne dla dobrego kontaktu na granicy implantu i kości, a jednocześnie na tyle małe, by nie stanowiły ryzyka uwolnienia pozostałości poprocesowych do organizmu. Mimo że opisane w tej pracy badania wykazały zależność pomiędzy rozmiarem cząstek ścierniwa a chropowatością i składem chemicznym obrabianej powierzchni, otrzymane wyniki nie stanowią podstawy do określenia relacji pomiędzy rozmiarem użytych cząstek a zwilżalnością powierzchni i odpowiedzią biologiczną komórek hodowanych z nimi w kontakcie. Można stwierdzić, że piaskowanie podwyższyło cytotoksyczność powierzchni, o czym świadczy mniejsza śmiertelność komórek na powierzchniach polerowanych mechanicznie. Mając na uwadze, że piaskowane biomateriały na bazie tytanu i jego stopów są uważane za dobre podłoża dla osadzania się i proliferacji komórek osteoblastów [13,14], przyjęto, że przyczyną niewielkiej odpowiedzi biologicznej w stosunku do otrzymanych powierzchni jest sposób ich przygotowania. Nawet czyszczenie próbek kolejno w acetonie, alkoholu i wodzie przy pomocy myjki ultradźwiękowej nie było zabiegiem wystarczającym do usunięcia cząstek ścierniwa, które wbudowały się w materiał podczas piaskowania, a później zostały uwolnione do medium hodowlanego. W pracach innych autorów wskazywano, że przenikanie glinu z powierzchni piaskowanych cząstkami tlenku glinu może być przyczyną słabej proliferacji komórek osteoblastopodobnych na takich elementach [11]. Potwierdzeniem założenia, że w przypadku badanych w tej pracy materiałów również doszło do odkładania się pozostałości poprocesowych są wskazania składu pierwiastkowego badanych powierzchni, uwzględnione w kontekście rodzaju użytych cząstek piaskujących.

By and large, the conducted study proved that sandblasting of biomaterials leads to a difference in their properties that can be observed while evaluating the behaviour of cells adhered to the given surfaces. Many other papers published so far indicate particular size spectra of the blasting medium, where some of them advise application of particles falling into relatively narrow 25-75 μm range [12]. The main objective of the adjustment of abrasive particles size is finding beads big enough to produce roughness that would be suitable for implant and tissue interlocking, but at the same time, substantially small so the surface would not release toxic ions to the external environment. Even though there was a clear dependency between the blasting particles size and the resulting roughness and chemical composition, no such relationship was observed for neither surface wettability nor biological response. It can be stated that sandblasting resulted in elevated surface cytotoxicity compared to mechanical polishing. Owing to the fact that rough sandblasted surfaces of titanium-based biomaterials are considered to be suitable for osteoblasts that are likely to settle and proliferate onto such surfaces [13,14], it was assumed that the particular process of sandblasting conducted in the study could be a reason for poor biological response of the cells towards the prepared surfaces. Even after ultrasonic cleaning in acetone, alcohol and water, the surfaces still possessed residues of the blasting medium embedded into the bulk material, which penetrated into the cell culture medium. It was already noticed that aluminium releases from the sandblasted surfaces may be a reason for poor osteoblast-like cells [11]. The assumption of occurrence of processing residues in the examined samples is in agreement with the results of EDS analysis which revealed the presence of the Si, Na, O and Al residues, showing that the applied blasting medium contained not only Al_2O_3 particles. Apart from the aforementioned, some additional amounts of Na_2O and SiO_2 are present as well. Despite the lack of clear correlation between the size of the blasting medium and surface wettability, it is expected that change in the biomaterial chemical composition is also a reason for alternations in its wettability. In order to reduce occurrence of the processing residues that influence properties of the manufactured elements, the step of finishing of sandblasted surfaces may be enriched by additional treatment methods. It was shown that sandblasted surfaces, apart from standard cleaning procedures, may be also subjected to electropolishing [15].

Zgodnie z kartą charakterystyki, używane ścierniwo składało się głównie z Al_2O_3 , niemniej obecne są również domieszki Na_2O i SiO_2 , co tłumaczy podwyższoną zawartość tlenu i glinu, a także dodatkową obecność sodu i krzemu na badanych powierzchniach. Chociaż nie zauważono jasnej zależności między wielkością zastosowanych cząstek a zwilżalnością obrabianej powierzchni, przypuszcza się, że ulegająca zmianie hydrofilowość ma swoje podłoże w różnym składzie chemicznym wynikającym z wbudowywania się cząstek ścierniwa w biomateriał. W celu zredukowania pozostałości poprocesowych zmieniających właściwości gotowego elementu, etap wykańczania powierzchni piaskowanych biomateriałów można wydłużyć, dodając kolejne metody obróbki powierzchni. Jak sugerują prace innych autorów, prócz standardowych procesów czyszczenia, próbki po piaskowaniu można poddawać dodatkowym zabiegom obróbki elektrochemicznej [15].

Zgodnie z wynikami przeprowadzonych badań, najlepszą odpowiedzią biologiczną odznaczyły się próbki piaskowane ścierniwem o wielkości cząstek w zakresie 53-75 μm (seria s.60). W pozostałych przypadkach komórki zasiedlały mniejszą powierzchnię i to w sposób nierównomierny, przybierając nieregularne kształty. Analiza właściwości biologicznych próbek piaskowanych medium o różnej wielkości ziarna nie przyniosła jasnych zależności. Porównując stopień proliferacji komórek dla obu użytych stopów, zauważyć można trend, gdzie powierzchnie zawierające wanad zasiedlane były przez większą liczbę komórek w porównaniu do ich bezwanadowych odpowiedników. Pomimo stosunkowo wysokich odchyień standardowych dla przebadanych przypadków, analiza wariancji ANOVA potwierdziła tę zależność dla serii próbek s.115. Jest to o tyle interesujące, że obecnie, aby uniknąć potencjalnego uwolnienia wanadu do organizmu, stopy Ti-6Al-4V zastępuje się materiałami niezawierającymi tego pierwiastka, między innymi stopem Ti-6Al-7Nb.

Wnioski

W niniejszej pracy dążono do określenia różnic wynikających z piaskowania biomateriałów na bazie tytanu ścierniwem o różnej wielkości cząstek. Przeprowadzone badania dowiodły, że rozmiar ziaren medium piaskującego ma wpływ na chropowatość, zwilżalność oraz na skład chemiczny modyfikowanych elementów, a także prowadzi do zmiennej odpowiedzi biologicznej komórek stykających się z takimi powierzchniami. Wykazano, że chropowatość powierzchni jest skorelowana z rozmiarem cząstek ścierniwa i zwiększa się wraz ze wzrostem ich średnicy, powodując jednoczesną zmianę składu chemicznego obrabianej powierzchni. Mimo to, nie sposób określić prostej zależności między warunkami piaskowania a zachowaniem komórek osteoblastopodobnych hodowanych w kontakcie z przygotowanymi powierzchniami. Ocena właściwości biologicznych piaskowanych powierzchni wykazała, że najwyższą proliferacją komórek spośród próbek modyfikowanych tą metodą charakteryzowały się powierzchnie traktowane cząstkami tlenku glinu o wielkości 53-75 μm . Niższą proliferację, w porównaniu do kontroli, zaobserwowano w przypadku wszystkich próbek poddawanych piaskowaniu. Ponadto, powierzchnie piaskowane wykazały wysoką cytotoksyczność. Efekt ten można przypisać wbudowywaniu się cząstek ścierniwa w powierzchnię materiału, a następnie ich uwalnianiu do medium komórkowego podczas hodowli.

Podziękowania

Autorzy pragną podziękować dr Witoldowi Szymańskiemu, który umożliwił przeprowadzenie procesu piaskowania badanych w pracy elementów.

As shown in the results, the best biological response towards the sandblasted surfaces was obtained for samples treated with abrasive medium which size fell in range of 53-75 μm (series s.60). For the rest of the cases, the number of cells that adhered to the surface was smaller and the cells took abnormal shape. The analysis resulted in no straightforward relationship between the size of the sandblasting particles and the resulting osteoblast-like cells' behaviour. By comparing the proliferation level for both titanium alloys used, one can notice a tendency that the niobium-containing alloy evoked worse cell proliferation than its vanadium-containing counterpart. Despite relatively high standard deviations for the particular cases, The ANOVA analysis of variance outlined statistical significance in differences between the materials subjected to sandblasting in series s.115. This phenomenon was particularly interesting regarding to the current trend to exchange implants made of Ti-6Al-4V with Ti-6Al-7Nb-based devices in order to avoid a release of toxic vanadium to the human organism.

Conclusions

The following study aimed to investigate differences resulting from the application of different size of abrasive particles during sandblasting of the titanium-based biomaterials. The conducted tests proved that the varying size of the blasting beads influences roughness, wettability and chemical composition of the sandblasted elements and it stands for changes in biological response of the osteoblast-like cells cultured on the modified surfaces. The surface roughness was inseparably related to the size of the blasting particles and it increased substantially with the increasing size of particle diameter, simultaneously changing surface chemical composition. On the other hand, there was no straightforward correlation between size of the applied particles and biological response towards the examined surfaces. The analysis revealed that the best cell proliferation level was obtained within samples sandblasted by 53-75 μm alumina particles. All the sandblasted specimens evoked lower cell proliferation than the control samples. Application of sandblasting resulted in high surface cytotoxicity which is expected to come from blasting particles becoming embedded into the materials and later released to the cell culture medium.

Acknowledgments

The authors would like to thank Witold Szymański, PhD who made sandblasting of the study specimens possible.

Pismiennictwo

- [1] Elias C.N., Lima J.H.C., Valiev R., Meyers M.A.: Biomedical Applications of Titanium and its Alloys. The Journal of The Minerals, Metals & Materials Society 60 (3) (2008) 46.
- [2] Alla R.L., Ginjupalli K., Upadhy N., Shamma M., Ravi R.K., Sekhar R.: Surface Roughness of Implants: A Review. Trends in Biomaterials & Artificial Organs 25(3) (2011) 112-118.
- [3] Buser D., Schenk R.K., Steinemann S., Fiorellini J.P., Fox C.H., Stich H.: Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs. Journal Of Biomedical Materials Research 25 (1991) 889-902.
- [4] Anselme K., Bigerelle M.: Topography effects of pure titanium substrates on human osteoblast long-term adhesion. Acta Biomaterialia 1 (2005) 211-222.
- [5] Gotfredsen K., Berglund T., Lindhe J.: Anchorage of titanium implants with different surface characteristics: an experimental study in rabbits. Clinical Implant Dentistry and Related Research 2 (2000) 120-128.
- [6] Klokkevoeld P., Nishimura R.D., Adachi M., Caputo A.: Osseointegration enhanced by chemical etching of the titanium surface. A torque removal study in the rabbit. Clinical Oral Implants Research 8 (1998) 442-447.
- [7] Guehenne L., Lopez-Heredia M.A., Enkel B., Weiss P., Amouriq Y., Layrolle P.: Osteoblastic cell behaviour on different titanium implant surfaces. Acta Biomaterialia 4 (2008) 535-543.
- [8] Bächle M., Kohal R. J.: A systematic review of the influence of different titanium surfaces on proliferation, differentiation and protein synthesis of osteoblast-like MG63 cells. Clinical Oral Implants Research 15 (2004) 683-692.

References

- [9] Brunette D. M.: Titanium in Medicine: Material Science, Surface Science, Engineering, Biological Responses, and Medical Applications. Springer Science & Business Media, 2001.
- [10] Oshida Y.: Surface Engineering and Technology for Biomedical Implants. Momentum Press, 2014.
- [11] Anselme K., Linez P., Bigerelle M., Le Maguer D., Le Maguer A., Hardouin P., Hildebrand H.F., Lost A., Leroy J.M.: The relative influence of the topography and chemistry of TiAl6V4 surfaces on osteoblastic cell behavior. Biomaterials 21 (2000) 1567-1577.
- [12] Łukaszewska M., Gajdus P., Hędzulek W., Zagalak R.: Development of titanium implants surface. Review. Implantoprotetyka 10 3(36) (2009) 24-29.
- [13] Schuler M., Owen G.R., Hamilton D.W., de Wild M., Textor M., Brunette D.M., Tosatti S.G.: Biomimetic modification of titanium dental implant model surfaces using the RGDSP-peptide sequence: a cell morphology study. Biomaterials 27 (2006) 4003-4015.
- [14] Germanier Y., Tosatti S., Brogini N., Textor M., Buser D.: Enhanced bone apposition around biofunctionalized sandblasted and acid-etched titanium implant surfaces. Clinical Oral Implants Research 17 (2006) 251-257.
- [15] Wang J.H., Surface preparation techniques for biomedical applications. W: Driver M., Coatings for Biomedical Applications. Woodhead Publishing Limited (2012) 143-175.