

Magdalena Łukaszewska-Kuska

**„Ocena potencjału osteoblastów w procesie osteointegracji
na różnie modyfikowanych powierzchniach tytanu.**

Badania *in vitro*.”

Rozprawa doktorska

Promotor:

prof. dr. hab. n. med. Wiesław Hędzielek

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Klinika Protetyki

Poznań 2013

Panu Prof. dr hab. n. med. Wiesławowi Hędzelkowi
dziękuję za pomoc i wskazówki udzielone
podczas realizacji rozprawy doktorskiej.

5.	Wyniki badań i ich omówienie	52
5.1.1.	Badania wstępne	52
5.1.2.	Badania zasadnicze	55
5.1.2.1.	Analiza topografii badanych powierzchni	55
5.1.2.2.	Analiza chropowatości	60
5.1.2.3.	Analiza składu chemicznego	65
5.1.2.4.	Analiza właściwości biologicznych modyfikowanych powierzchni tytanu	66
5.1.2.4.1.	Ocena żywotności komórek	66
5.1.2.4.2.	Ocena stężenia białka	68
5.1.2.4.3.	Ocena aktywności fosfatazy alkalicznej	69
5.1.2.4.4.	Ocena stężenia prostaglandyny E2	70
5.1.2.4.5.	Ocena wzrostu komórek w długo kondycjonowanym medium	71
5.1.2.4.6.	Analiza obrazów SEM hodowli na badanych powierzchniach	73
6.	Dyskusja	84
6.1.	Badania wstępne	84
6.2.	Badania zasadnicze	90
7.	Wnioski	106
8.	Streszczenie	107
9.	Summary	109
10.	Piśmiennictwo	111
11.	Spis tabel	125
12.	Spis rycin	126

Wykaz ważniejszych skrótów

BCP – dwufosforan wapnia

EDS - spektroskopia z dyspersją energii promieniowania rentgenowskiego

HA – hydroksyapatyt

Ra - średnie arytmetyczne odchylenie profilu od linii średniej mierzone wzdłuż odcinka pomiarowego lub elementarnego

Rq - średnie kwadratowe odchylenie profilu od linii średniej wzdłuż odcinka pomiarowego lub elementarnego

Sa - średnie arytmetyczne odchylenie wysokości nierówności powierzchni od płaszczyzny odniesienia

Scx - średni arytmetyczny rozstaw nierówności

Sdr - współczynnik powierzchni rozwinięcia obszaru wydzielonego

SEM – skaningowa mikroskopia elektronowa

Sm - średnia wartość z odstępów chropowatości S_{mi} występujących w przedziale odcinka elementarnego

Str - współczynnik struktury geometrycznej powierzchni

Sq - średnie kwadratowe odchylenie powierzchni od płaszczyzny odniesienia

S Δ q - średniokwadratowe pochylenie nierówności powierzchni

TCP – trójfosforan wapnia

Δ q - średnie kwadratowe pochylenie profilu względem linii średniej

1. Wprowadzenie.

Implantologia jako dziedzina stomatologii dotyczy śródtkankowego wprowadzania alloplastycznego lub ksenogenego materiału w celu stworzenia warunków dla protetycznej rekonstrukcji uzębienia lub tkanek twarzy (np. przy użyciu epitezy), rehabilitacji funkcjonalnej i poprawy estetycznej oraz uniknięcia postępu procesów inwolucji (1).

Implantologia jest dynamicznie rozwijającą się dziedziną a badania jej dotyczące prowadzone są od szeregu lat. Już od przełomu wieków XIX i XX prowadzono badania nad różnorodnymi metodami i lokalizacjami implantacji, materiałami i kształtami implantów. Badane były implanty podokostnowe, wewnątrzśluzówkowe, endodontyczne i śródkostne (2). Oceniano metody implantacji natychmiastowej bezpośredniej, natychmiastowej odroczonej i implantacji późnej implantów śródkostnych. Porównywano implanty cylindryczne w postaci cylindrów i śrub, implanty żyłkowe i dyskowe wykonane z metali, ceramiki bądź materiałów łączonych (2). Za przełomowy w rozwoju implantologii uznaje się rok 1952 kiedy to zespół Dr. Per Ingvara Brånemarka z Uniwersytetu w Lund w Szwecji użył tytanu jako materiału implantacyjnego. Zaobserwowano wówczas, że tytan wprowadzony w tkankę kostną zrasta się z nią. Fenomen ten został nazwany osteointegracją czyli bezpośrednim strukturalnym i funkcjonalnym połączeniem organicznej, żywej kości z powierzchnią obciążonego implantu. (1, 3, 4, 5, 6).

Aktualnie w implantologii stomatologicznej za standard uważa się implanty śródkostne a najczęściej stosowanym materiałem przy ich wykonawstwie jest tytan i jego stopy. Według American Society for Testing and Materials (ASTM) tytan dzieli się na cztery stopnie komercyjnej czystości. Stopy tytanu natomiast dzielą się na klasy od 5 do 29. Jako materiał do wykonawstwa implantów stosuje się komercyjnie czysty tytan klasy 4 (cpTi 4) oraz stop tytanu klasy 5 Ti-6Al-4V ponieważ charakteryzują się one korzystniejszą od pozostałych

wytrzymałością mechaniczną. Ponadto wymienione materiały charakteryzują się wysoką biogodnością która pozwala na osteointegrację implantu z kością ale także cechują się dużą odpornością na korozję w środowisku płynów ustrojowych, niską gęstością, niskim przewodnictwem ciepła, odpornością na korozję wżerną, międzykrystaliczną i naprężeniową oraz wagą porównywalną do stali (5, 7, 8, 9, 10).

Na wynik leczenia implantologicznego wpływ ma szereg czynników. Są to: technika zabiegu, stan kości w miejscu implantacji, geometria implantu, powierzchnia implantu, biokompatybilność materiału z którego wytworzony jest implant oraz warunki obciążenia (5, 6, 7, 11, 12, 13, 14).

Jako powierzchnię implantu należy rozumieć jej właściwości fizyczne i chemiczne. Dowiedziono, iż aktywność funkcjonalna komórek w bezpośrednim sąsiedztwie wszczepu jest wrażliwa na właściwości powierzchni implantu (15). W skali makro zauważyć można zależność między wgajaniem implantów o różnych modyfikacjach powierzchni na modelach zwierzęcych. Zauważalnie szybszą osteointegrację zauważa się w przypadku implantów o powierzchni chropowatej która ma za zadanie zwiększyć zdolność zakotwiczenia implantu w kości. Zmiany topografii powierzchni implantów mogą również skutkować zmianami składu chemicznego powierzchni, energii powierzchniowej czy grubości warstwy tlenków (7, 15, 16).

2. Przegląd piśmiennictwa

Jako standard współczesnej implantologii uznaje się implanty śródkostne wykonane z tytanu i jego stopów. Są one stosowane od lat siedemdziesiątych XX wieku i od tego czasu ulegały szeregowi modyfikacji. Zmieniał się między innymi ich kształt, rodzaj gwintu, powierzchnia.

Modyfikacje te miały na celu przyspieszenie procesu osteointegracji jak i poprawę długoczasowego wyniku leczenia implantologicznego (17).

Pierwotnie implanty śródkostne, wytwarzane z tytanowego pręta na drodze frezowania, miały powierzchnię nie modyfikowaną określaną jako maszynową. Była to stosunkowo gładka powierzchnia charakteryzująca się obecnością równoległych bruzd powstałych w procesie frezowania. W roku 1976 wprowadzono pierwszą modyfikację powierzchni implantów w postaci powłoki utworzonej na drodze napyłania plazmy tytanowej na powierzchnię implantu. W ten sposób uzyskano powierzchnię o większej niż wcześniejsza chropowatości. Dalszy rozwój powierzchni wszczepów polegał na zwiększaniu ich chropowatości bądź/i modyfikacji jej składu chemicznego. Pojawiały się wszczepy o grubej powłoce hydroksyapatytowej, wszczepy o powierzchni piaskowanej Al_2O_3 , HA, TCP, o powierzchni trawionej, piaskowanej i trawionej, o powierzchni anodyzowanej (2, 5). Wszystkie te modyfikacje miały na celu stworzenie powierzchni która stymulowałaby tkankę kostną celem osiągnięcia szybkiej i silnej osteointegracji.

Na podstawie przeprowadzonych badań można przyjąć, że najbardziej optymalna dla intensywnej odpowiedzi tkanki kostnej jest powierzchnia implantu o umiarkowanej chropowatości. Wennerberg na podstawie analizy 100 publikacji podaje, że implanty o średniej chropowatości określonej parametrem $Sa > 1-2\mu m$ powodowały intensywniejszą odpowiedź tkanki kostnej w porównaniu z implantami o powierzchni gładkiej ($Sa < 0,5\mu m$), minimalnie chropowatej ($Sa 0,5-1\mu m$) a także z częścią implantów o powierzchni chropowatej ($Sa > 2\mu m$) (18). Zbyt duży stopień chropowatości wszczepu niekorzystnie wpływa na oddziaływanie pomiędzy tytanem a kością przez zwiększone uwalnianie jonów, zwiększenie naprężeń i utrudnioną adhezję komórek (19). Bardzo chropowate powierzchnie są identyfikowane przez komórki jako powierzchnie gładkie ponieważ odległość między szczytami wzniesień jest duża. Druga hipoteza wskazuje przyczynę czysto mechaniczną.

Powierzchnia bardzo chropowata kontaktuje się z tkanką kostną jedynie szczytami wzniesień. Gładka powierzchnia natomiast w porównaniu z powierzchnią umiarkowanie chropowatą nie stymuluje tak intensywnie przebiegu procesu osteointegracji. Nie zapewnia ona dostatecznej retencji ze względu na zbyt małe tarcie jak również na gładkich powierzchniach komórki mają tendencję do spłaszczania się co z kolei ogranicza ich odżywianie (18). Gładka powierzchnia jest również łatwiej kolonizowana przez fibroblasty podczas gdy powierzchnia bardziej chropowata sprzyja kolonizacji, proliferacji i różnicowaniu osteoblastów stymulując wgajanie implantu w tkankę kostną. Powierzchnia umiarkowanie chropowata jest optymalna ze względu na doskonałe dopasowanie do tkanki łącznej i kostnej (5, 18, 20, 21, 22).

Celem uzyskania pozytywnej odpowiedzi tkanki kostnej na wszczepiany materiał wskazane jest zastosowanie biomateriału jako materiału z którego wykonany jest implant, jako jego powłoki bądź też jako elementu składowego jego powierzchni. Według Europejskiego Towarzystwa Biomateriałów za takowy uznaje się substancje lub związki substancji, pochodzenia syntetycznego lub naturalnego, z wyjątkiem lekarstw, które w określonym czasie wykazują właściwości rehabilitacyjne, zastępują tkanki, narządy i funkcje organizmu (23). Biomateriały stosowane w implantologii można podzielić ze względu na rodzaj materiału, pochodzenie, właściwości fizykochemiczne i strukturalne na materiały polimerowe, metale, materiały ceramiczne oraz materiały kompozytowe.

Tabela I. Biomateriały o właściwościach osteoindukcyjnych wg. Barradasa (24).

Polimery	polihydroksyetylmetakrylat		
Metale	Tytan		
Materiały ceramiczne	Naturalne	hydroksyapatyt, hydroksyapatyt /węglan wapnia (otrzymane z egzoszkieletu koralowców)	
	Syntetyczne	Niesyntetyzowany fosforan wapnia	trójfosforan wapnia, dwuhydrat dwufosforanu wapnia, bezwodny dwufosforan wapnia, hydroksyapatyt, dwufazowy fosforan wapnia, fosforan ośmiowapniowy
		Synteryzowany fosforan wapnia	pirofosforan, hydroksyapatyt, dwufazowy fosforan wapnia, trójfosforan wapnia, apatyt węglanowy
		inne	Al ₂ O ₃ , Bioglass®, Pyrex®
Kompozyty	HA/poly(D,L-laktyd)		

Biomateriały powinny cechować określone właściwości biologiczne (biokompatybilność) takie jak: brak toksyczności, teratogeniczności, kancerogeniczności, brak właściwości antygennych, niepodatność na infekcje/możliwość sterylizacji, stabilność biologiczna. Biomateriały powinny również cechować określone właściwości mechaniczne takie jak: stabilność kształtu, odporność mechaniczna i nieprzepuszczalność dla promieniowania. Biomateriały mogą się również charakteryzować właściwościami osteoindukcji, osteokondukcji bądź osteopromocji. Właściwości osteoindukcyjne wiążą się ze zdolnością inicjowania procesu tworzenia tkanki kostnej poprzez komórki pierwotnie nie związane z tworzeniem kości a więc stymulowaniem niskozróżnicowanych komórek tkanki łącznej do przemiany w osteoblasty i tworzeniu tkanki kostnej również w obszarach, gdzie w normalnych warunkach procesu tego nie można oczekiwać. Zdolności osteokondukcyjne

polegają z kolei na stworzeniu, dzięki odpowiedniej strukturze i składzie chemicznym, dogodnych warunków i ułatwianiu formowania tkanki kostnej na bazie istniejącej w sąsiedztwie kości. Materiał taki tworzy matrycę dla odbudowy kości która w ten materiał wrasta. Zdolności osteokondukcyjne wykazują zarówno przeszczepy kostne jak i materiały kościozastępcze organiczne i nieorganiczne (1, 25, 26). Osteopromocja to natomiast zdolność przyspieszanie odbudowy tkanki kostnej. Celem stosowania biomateriałów jest ułatwienie oraz przyspieszenie odbudowy tkanki kostnej (1, 25, 26).

2.1. Osteointegracja: interakcja tkanka – implant

Osteointegracja według definicji Brånemarka to bezpośrednie strukturalne i funkcjonalne połączenie organicznej, żywej kości z powierzchnią obciążonego implantu (27). Uznaje się, że połączenie tkanki kostnej z powierzchnią implantu ma dwojaki charakter: biomechaniczny i chemiczny. Połączenie biomechaniczne, tak zwany interlocking, następuje poprzez wrastanie tkanki kostnej w nieregularności powierzchni implantu i jest procesem długotrwałym. Klinicznie implant tuż po wprowadzeniu w łożę kostne uzyskuje stabilizację pierwotną dzięki swojej geometrii natomiast w dalszym etapie dochodzi do resorpcji tkanki kostnej co wiąże się z pogorszeniem stabilizacji implantu (12). Dopiero z czasem, w wyniku tworzenia tkanki kostnej, jej przebudowy i wrastania w nieregularności powierzchni implant uzyskuje stabilizację wtórną powstałą na bazie biomechanicznego połączenia z tkanką kostną. Połączenie chemiczne między tkanką kostną a powierzchnią implantu następuje natomiast natychmiastowo. Jest to wiązanie które działa na bardzo małej odległości. Przyjmuje się, że komercyjnie czysty tytan nie ma zdolności biochemicznego wiązania z tkanką kostną i wymaga modyfikacji chemicznych by tą zdolność uzyskać. Przyłączanie do powierzchni tytanu jonów wapnia, magnezu czy fluoru, obróbka termiczna bądź umieszczanie tytanu w

ogniwach galwanicznych pozwala na utworzenie wiązania biochemicznego między implantem a kością. Również materiały ceramiczne takie jak na przykład hydroksyapatyt uważa się za materiały posiadające zdolność wiązania biochemicznego z tkanką kostną. Powłoka utworzona z materiałów ceramicznych bądź też inkorporowanie ceramiki w powierzchnie tytanu pozwoliłoby na utworzenie wiązania biochemicznego z kością. Część autorów wyklucza jednak możliwość istnienia wiązania biochemicznego między implantem a tkanką kostną ze względu na istnienie ruchów międzyfazowych pomiędzy implantem a kością które nie pozwalałyby na utrzymanie tego typu wiązania (28).

Proces interakcji pomiędzy wszczepianym materiałem a tkanką jest procesem dynamicznym, wieloetapowym i zależnym od wielu czynników. W przypadku wszczepów śródkostnych decydującymi i najważniejszymi komórkami determinującymi odpowiedź tkankową na materiał są osteoblasty. Na ich odpowiedź istotnie wpływają właściwości powierzchni wszczepionego materiału.

Reakcję tkanki na wszczepiany materiał można podzielić na fazę niekomórkową czyli etap w którym dochodzi do adsorpcji protein na wszczepionym materiale. Faza ta ma miejsce bezpośrednio po zetknięciu wszczepianego materiału z płynami ustrojowymi a na jej przebieg wpływają właściwości fizykochemiczne materiału takie jak chropowatość, topografia, biegunowość, hydrofilność, ładunek elektryczny.

Wpływ na tą fazę ma również pH środowiska, skład jonowy, siła roztworu, temperatura, grupy funkcyjne białek i pozostałych substratów będących w sąsiedztwie wszczepianego materiału. Początkowo przyłączają się małe, szybko dyfundujące proteiny które są później zastępowane przez duże proteiny o silnym powinowactwie do powierzchni wszczepionego materiału. Pewne białka kości posiadają właściwości chemotaktyczne lub adhezyjne dzięki posiadanej sekwencji Arg-Gly-Asp (RGD). Jest to sekwencja specyficzna dla wiązania receptorów błony komórkowej takich jak integryny. Sekwencję RGD posiadają m. in.

peptydy takie jak fibronektyna, vitronektyna, osteopontyna, sialoproteiny kości, trombospontyna, kolagen typu I. Posiadają one zdolność promowania adhezji osteoblastów jak również mają silny wpływ na dojrzewanie matriksu oraz jego mineralizację (29, 30).

Kolejną fazą jest faza przyłączania biologicznych molekuł (zwnętrzkomórkowych białek macierzy, białek błony komórkowej, białek cytoszkieletu) które przyłączają się do powierzchni wszczepionego materiału i wchodzi między sobą w interakcje indukując późniejszą odpowiedź komórkową wpływając na migracje i różnicowanie komórek. Na fazę przyłączania wpływ mają siły jonowe oraz siły Van der Waalsa (29). Ów zwnętrzkomórkowy matriks stanowiący skomplikowane połączenie glikoprotein, kolagenu, proteoglikanów i czynników wzrostu stanowi nie tylko fizjologiczne rusztowanie służące przyłączaniu i organizowaniu się komórek ale również mediator dla powstawania wewnętrzkomórkowych sygnałów poprzez receptory powierzchni komórek które rozpoznają molekuly zwnętrzkomórkowego matriksu (12, 31).

Kolejną fazą jest faza komórkowa. Fazę ta można podzielić na okresy przyłączania, adhezji, migracji, proliferacji i różnicowania komórek. Jakość pierwszych trzech okresów ma duży wpływ na pojemność proliferacji i różnicowanie komórek na powierzchni implantu w okresach późniejszych.

Początkowo komórki przyłączają się do powierzchni materiału, jest to tzw.: „attachment phase”. Faza ta przebiega szybko i jest to krótkoczasowy fizykochemiczny proces na który wpływ mają siły jonowe oraz siły Van der Wallsa.

Kolejną fazą jest faza adhezji. Adhezja komórek do powierzchni materiału ma miejsce w ciągu pierwszych godzin kontaktu wszczepionego materiału z kością. Jest to pierwsza faza interakcji komórek z materiałem i ma ona istotny wpływ na późniejszy wzrost, proliferację, różnicowanie i migracje komórek. Jest to najbardziej krytyczny moment interakcji komórka-materiał. Jako, że przebieg procesu osteointegracji zależy od bezpośredniej interakcji

pomiędzy matrycą kości i osteoblastami z wszczepionym materiałem dlatego właśnie adhezja osteoblastów jest tak istotna dla przebiegu interakcji między implantem a kością (32, 33). Proces adhezji przebiega dłużej niż faza przyłączania. Udział w nim biorą biologiczne molekuly takie jak zewnątrzkomórkowe białka matriksu, białka błony komórkowej oraz białka cytoszkieletu. W procesie adhezji udział bierze szereg białek zarówno matriksu zewnątrzkomórkowego (fibronektyna, kolagen, laminina, vitronektyna), jak i białka cytoszkieletu (aktyna, talina i vinkulina) oraz receptory błony komórkowej (integryny). Na późniejszy wzrost i różnicowanie komórek wpływ ma sygnał powstały w wyniku interakcji między wymienionymi białkami a ich specyficznymi receptorami. Ponadto im więcej komórek przylega do powierzchni od pierwszych godzin poprzez kolejne tygodnie tym większą mają one zdolność do proliferacji (30, 31). Tak więc za adhezję komórek do powierzchni materiału i ich dalsze na nim zachowanie odpowiadają molekuly zewnątrzkomórkowego matriksu takie jak vitronektyna, fibronektyna, kolagen, laminina i fibryna. Te molekuly są następnie rozpoznawane i wiązane przez komórkowe receptory odpowiedzialne za adhezję, tzw. molekuly adhezyjne. W przypadku osteoblastów molekuly adhezyjne należą do grup integryn i kadheryn. Integryny zbudowane są z dwóch podjednostek, każda z nich składa się z dużego elementu zewnątrzkomórkowego, elementu przezbłonowego i krótkiego fragmentu cytoplazmatycznego. Integryny przesywają błonę komórkową i stanowią swoistą drogę oddziaływania pomiędzy przedziałem zewnątrzkomórkowym (białka matriksu) i wewnątrzkomórkowym (cytoszkielet). Mogą one przetłumaczyć przyłączenie zewnątrzkomórkowych ligand na wewnątrzkomórkową informację i przez to wpływać na adhezję, rozprzestrzenianie i migracje komórek a w konsekwencji wpływać na ich wzrost i różnicowanie. Kadheryny z kolei odpowiadają za adhezję komórka-komórka. Są to przezbłonowe glikoproteiny współdziałające z wewnątrzkomórkowymi Kareninami, które z kolei współdziałają z wewnątrzkomórkowymi

proteinami. Adhezja polega na przyłączaniu wewnątrzkomórkowych filamentów aktynowych do matriksu utworzonego wcześniej na powierzchni materiału przy udziale integrzyn. W ten sposób powstaje kontakt fokalny – płytka fokalna. W obrębie kontaktów fokalnych istotną rolę odgrywają integryny. Reakcja tkanek na powierzchni materiału jest właśnie związana z integrzynozależną adhezją komórkową. Formowanie kontaktów fokalnych *in vitro* jest promowane przez zewnątrzkomórkowe białka matriksu takie jak fibronektyna i vitronektyna. (29, 30).

Po fazie adhezji następuje faza migracja po powierzchni materiału. W tym celu niezbędne jest stworzenie dynamicznej interakcji pomiędzy komórką, materiałem a cytoszkieletem. Początkowo komórka tworzy wypustkę błony komórkowej w jednym z brzegów z której powstanie lamellopodium. Po utworzeniu i umocowaniu lamellopodium komórka generuje siłę trakcyjną oraz energię niezbędną do przemieszczenia się. Ostatnim etapem jest uwolnienie tyłu komórki i jego retrakcja. W proces migracji zaangażowane są integryny. Komórki mało ruchliwe tworzą silną adhezję fokalną, komórki bardziej ruchliwe tworzą mniej struktur adhezyjnych. Pośrednia wartość siły przyłączania przekłada się natomiast na najwyższą zdolność do migracji.

Kolejnym etapem kolonizacji powierzchni materiału przez komórki jest faza proliferacji. Komórki zależne od zakotwiczenia, tzw.: anchorage-dependent, dzielą się tylko po wydłużeniu na powierzchni hodowlanej. Ich podział zależy od połączenia z podłożem. Tak więc stopień pokrycia podłoża przez komórki jest skorelowany z ich aktywnością proliferacyjną. Pokrycie podłoża przez komórki warunkują ich proliferacje i jest z kolei związane z zaadsorbowanymi na powierzchni molekułami mediującymi adhezję komórek (50). Następnie dochodzi do ich różnicowania. Ostatnią fazą osteointegracyjnego różnicowania komórek na powierzchni materiału jest produkcja osteoidu–

niezmineralizowanej macierzy kostnej. Ostatecznym etapem interakcji kość-materiał jest faza mineralizacji (29, 30, 34).

2.2. Metody oceny właściwości biologicznych materiałów implantologicznych

Ocenę prognozowanego przebiegu osteointegracji można przeprowadzić w badaniach *in vitro*, które stanowią hodowle komórkowe, pomiar adsorpcji białek czy tworzenia kryształów HA. Z kolei w badaniach *in vivo* w ocenie osteointegracji można korzystać z modeli ludzkich bądź zwierzęcych stosując metody inwazyjne a także nieinwazyjne.

Stopień osteointegracji wszczepu śródkostnego *in vivo* można ocenić stosując różne techniki. Na bezpośrednią ocenę ilościową i jakościową powierzchni kontaktu implant – kość pozwalają preparaty będące przekrojem połączenia badanej tkanki i wszczepu. Tego typu preparaty umożliwiają analizę histologiczną - ocenę jakościową komórek i histomorfometryczną tkanki kostnej czyli ocenę ilościową komórek, przeprowadzenie pomiarów liniowych i powierzchniowych (szerokość, grubość, długość, powierzchnia, obwód) a także analizę trójwymiarową (objętość) (35). Procedura laboratoryjna stosowana przy przygotowywaniu tego rodzaju preparatów jest jednak bardzo czasochłonna dlatego też stosowana jest głównie w badaniach naukowych (35). Przygotowanie preparatów histologicznych zawierających przekrój połączenia tkanki kostnej z implantem jest czasochłonne i skomplikowane. Składa się na nie: utrwalenie segmentów zawierających tkankę kostną wraz z wgojonym wszczepem, zatopienie ich w żywicy, cięcie i szlifowanie dzięki którym otrzymujemy cienkie preparaty zawierające przekrój połączenia implant-kość, ostatnim etapem jest barwienie skrawków. Tak przygotowane preparaty analizuje się w świetle przechodzącym przy użyciu mikroskopu świetlnego.

Ocenę stopnia osteointegracji można przeprowadzić również klinicznie na modelu ludzkim bądź zwierzęcym za pomocą metod inwazyjnych oraz nieinwazyjnych. Do metod nieinwazyjnych można zaliczyć: zdjęcia rentgenowskie, analiza częstotliwości drgań przy pomocy urządzenia Osstell, ocenę stabilności przy pomocy urządzenia Periotest (14, 36, 37, 38, 39). Natomiast do metod inwazyjnych należą: ocena wstecznego momentu obrotowego, kliniczny pomiar oporu gwintowania podczas implantacji wszczepu, testy typu pull-out, push-out oraz pomiar momentu obrotowego przy usuwaniu implantu po jego osteointegracji (38, 39, 40, 41).

Istnieją również nieinwazyjne metody oceny samej tkanki kostnej pod kątem jej przydatności do zabiegu implantacji. Jest to przede wszystkim diagnostyka radiologiczna a także analiza Fouriera i fraktalna (42, 43).

W przypadku oceny *in vitro* właściwości biologicznych badanego materiału przeprowadzić można testy biokompatybilności które zostały opracowane celem symulacji oraz prognozowania reakcji biologicznej na materiały umieszczone wewnątrz lub na powierzchni tkanek żywego organizmu. Testy te można prowadzić między innymi przy użyciu hodowli komórkowych.

Jednym z rodzajów testów biokompatybilności materiałów jest test cytotoksyczności. Testy cytotoksyczności są testami które wykazują efekt wywierany na komórki po stosunkowo krótkim okresie ekspozycji na substancję. Testy te mogą trwać 12, 24 godziny i dłużej. Komórki przetrwają bądź obumrą w wyniku uszkodzenia chemicznego. Inne rodzaje testów biokompatybilności testujące aktywację procesów biologicznych wymagają dłuższego czasu trwania badania. Powyższe badania oceniają reakcje zapalne, reakcje immunologiczne oraz reakcje mutagenne (44).

Hodowla komórkowa została przyjęta jako technika w latach dwudziestych XX wieku natomiast testy *in vitro* oceny cytotoksyczności zostały wprowadzone 30 lat później, w latach

50-tych i 60-tych. Pierwsza standaryzacja tego typu badań miała miejsce w 1983 roku kiedy to Amerykańskie Stowarzyszenie Testów i Materiałów (ASTM) sformułowało szereg standardów między innymi standard F813-83: Standardowe postępowanie dla hodowli komórkowych w bezpośrednim kontakcie oceniające materiały do produkcji urządzeń medycznych. W latach późniejszych również Międzynarodowa Organizacja dla Standaryzacji (ISO) wprowadzała kolejne standaryzacje (44).

Testy użytkowe takie jak testy hodowli komórkowych i testy implantacyjne koncentrują się na efektach miejscowych testowanych materiałów czyli efektach reakcji cytotoksycznej czy odpowiedzi zapalnej. Jednakże biomateriały mogą również powodować reakcje alergiczne, mutagenne, teratogenne lub organozależną reakcję toksyczną. Równocześnie różne metody badania odnoszą się do różnych poziomów biologicznych. Dlatego nie jest możliwe przetestowanie materiału jednym testem wyłącznie. Potrzebne jest więc podejście wliczające baterię metod testowych. Autian proponuje koncepcje 3 poziomów wg schematu: 1) toksyczność niespecyficzną (hodowle komórkowe lub małe zwierzęta laboratoryjne) 2) toksyczność niespecyficzną (testy użytkowe np. u naczelnych) 3) testy kliniczne u ludzi (45).

Materiały planowane do użycia jako implanty są zazwyczaj testowane w warunkach *in vitro* na hodowlach komórkowych po czym przystępuje się do testów *in vivo* na zwierzętach. Linie komórkowe stanowią homogenne, dobrze zdefiniowane, relatywnie łatwo dostępne i łatwo hodowane populacje komórkowe które umożliwiają badanie wielu różnych próbek materiału dając powtarzalne wyniki (46). Stanowią one swego rodzaju układy modelowe pozwalające na ocenę reakcji komórek na materiał. Wyniki badań przy użyciu linii komórkowych uzyskuje się w sposób znacznie szybszy i prostszy w porównaniu z badaniami na zwierzętach. Stosowane do oceny interakcji komórka-materiał linie komórkowe można podzielić na linie komórkowe pierwotne i linie komórkowe ciągłe. Linie komórkowe pierwotne pochodzą z normalnej tkanki diploidalnej i charakteryzują się określonym czasem życia wyrażonym

ograniczoną liczbą pasaży. Po zaprogramowanym czasie życia komórki linii pierwotnych ulegają apoptozie. Tego typu hodowle są bardziej wrażliwe na warunki środowiskowe niż linie ciągłe jednakże ich czułość na właściwości powierzchni na której są hodowane pozwala na wnikliwą ocenę interakcji komórka-materiał. Do badań materiałów implantacyjnych można użyć nisko pasażowanych pierwotnych linii komórkowych pochodzenia zwierzęcego lub ludzkiego takich jak na przykład osteoblasty ludzkie lub też komórki macierzyste (mezenchymale czy embrionalne). Stosując linie komórkowe ludzkich osteoblastów można uzyskać informacje o możliwościach potencjalnej osteointegracji badanego materiału.

Linie komórkowe ciągłe stanowią komórki izolowane z guzów i charakteryzują się nieograniczonym czasem życia. Charakteryzują się one niezakłóconym metabolizmem i stałym genotypem. W badaniach materiałów implantacyjnych stosowane są linie komórek ludzkich pochodzące z tkanki kostnej - osteoblastopodobne komórki nowotworowe takie jak: CPC-2, TE-85, MG-63, SaOS-2, U-2OS. Określane są one jako linie tkankopodobne a więc w przypadku komórek pochodzenia kostnego - osteoblastopodobne. Linie te pochodzą z osteosarkomy ale zachowały właściwości istotne dla komórek kościotwórczych takie jak aktywność fosfatazy alkalicznej czy produkcję osteokalcyny (46, 47).

2.3. Modyfikacje powierzchni implantów

Modyfikacje powierzchni według metody jej opracowania można podzielić na 3 grupy według poniższego schematu:

1. Opracowanie maszynowe
2. Metody addycyjne – powlekające:
 - powłoka z napyłonej plazmy tytanowej
 - powłoka hydroksyapatytowa

3. Metody ablacyjne – pomniejszające:

- powierzchnia wytrawiana
- powierzchnia anodowo wytrawiana
- powierzchnia poddana obróbce strumieniowo-ściernej
- powierzchnia poddana obróbce strumieniowo-ściernej i wytrawiana (1).

Opracowanie maszynowe polega na frezowaniu z tytanowego pręta implantu. W wyniku obróbki na powierzchni tytanu powstają równoległe bruzdy. Jest to powierzchnia izometryczna, anizotropowa, charakteryzuje się ona obecnością zorientowanych, równoległych bruzd $\leq 10 \mu\text{m}$. Składa się głównie z dwutlenku tytanu oraz węgla. Chropowatość tego typu wszczepów jest niewielka i wynosi $R_a 0,1 - 0,8 \mu\text{m}$; $S_a 0,53 - 0,83 \mu\text{m}$ (48).

Powłoka z napyłonej plazmy tytanowej powstaje w wyniku dospawania w atmosferze argonu cząsteczek tytanu rozgrzanych w łuku elektrycznym. Ma ona grubość około $30 - 40 \mu\text{m}$. W porównaniu z powierzchnią maszynową 6-krotnie powiększa powierzchnię wszczepu. Jest ona znacznie bardziej chropowata niż poprzednia, parametr R_a wynosi tu około $9-10 \mu\text{m}$ (48). Powłokę hydroksyapatytową można uzyskać na szereg sposobów m.in. na drodze depozycji elektroforetycznej, dip coating, izostatycznego prasowania termicznego, flame spraying, plasma spraying i laserowej depozycji pulsacyjnej. Metodą najczęściej stosowaną jest metoda plasma spraying. Powłoka hydroksyapatytowa uzyskana metodą napyłania ma około $50 \mu\text{m}$ grubości i jest powierzchnią izotropową o chropowatości wielkości $8,2 - 10,2 \mu\text{m}$ (48).

Powierzchnie trawione najczęściej uzyskiwane są na drodze podwójnego trawienia – tzw. Double Etching (DE). Stosowane są tu mieszaniny kwasów: $\text{HCl} + \text{H}_2\text{SO}_4$ a także $\text{HF} + \text{HNO}_3$. Charakterystyczna dla powierzchni typu DE jest tzw. mikrostruktura. Powierzchnia ta ma charakter izotropowy - bez dominującego kierunku struktury, z licznymi nieregularnościami. Obecne są na niej niewielkie wgłębienia o średnicy około $0,5 - 3 \mu\text{m}$

powstałe w wyniku trawienia. Chropowatość tej powierzchni nie jest duża: Ra 0,62 - 0,83; Sa 0,46 μ m (48).

Powierzchnia anodowo wytrawiana określana również jako oksydowana lub anodyzowana to powierzchnia uzyskana w wyniku elektrochemicznej oksydacji anodowej w trybie galwanostatycznym. Proces rozwinięcia powierzchni przebiega w roztworach elektrolitów, zazwyczaj H₂SO₄ + H₃PO₄, lub też kwasu HF. Uzyskana w ten sposób powierzchnia jest izotropowa, chropowata - Sa > 2 μ m. Powierzchnia ma charakterystyczny kwiecisty wzór który tworzą pory o wielkości 1-5 μ m. Powierzchnię oksydowaną można również uzyskać na drodze Micro Arc Oxidation (MAO) w układzie następujących elektrod: tytanowa anoda i 2 katody platynowe. Proces oksydowania powierzchni można przeprowadzać również w podwyższonej temperaturze. Wraz ze wzrostem temperatury dochodzi do pogrubienia warstwy tlenków z 3-4nm do 40 μ m, co daje większą odporność implantu na korozję oraz indukuje szybszą osteointegrację we wczesnych okresach wgajania. Wrasta w tej metodzie niestety również kruchość tytanu (48).

Powierzchnia piaskowana uzyskiwana jest na drodze bombardowania powierzchni tytanu cząsteczkami tlenku glinu, tlenku tytanu bądź hydroksyapatytu. Jest to powierzchnia nieregularna, chropowata, z licznymi kraterami powstałymi w wyniku piaskowania izotropowa. Jej chropowatość waha się w granicach Ra 1-3 μ m i mniej; Sa 1,12 μ m. Najczęściej stosowanym do piaskowania materiałem jest Al₂O₃. Wielkość ziaren waha się od 25 do 250 μ m (49). Zwiększenie ich wielkości skutkuje zwiększeniem chropowatości powierzchni. Dowiedziono jednak, iż najlepsze efekty osteointegracji uzyskuje się przy wielkości ziaren 25-75 μ m. Uzyskana w ten sposób powierzchnia charakteryzuje się mikroretencją odpowiednią aby zapewnić pożądaną interlocking z tkanką kostną (Ra 0,82 μ m), ale nie nadbyt chropowata żeby uwalniać jony. Uzyskane w tej metodzie nierówności są bardziej regularnie rozmieszczone i poprawiają proces wgajania. Piaskowanie tlenkiem glinu

powoduje pozostawanie niewielkich ilości tego związku na powierzchni tytanu (49). Takie zanieczyszczenie może wg niektórych autorów utrudniać gojenie tkanki kostnej. W technologii piaskowania implantów TiO_2 stosuje się ziarna wielkości 10-125 μm . Do piaskowania powierzchni tytanu stosuje się również HA lub inne postacie fosforanu wapnia, np. β -TCP. Tak przygotowana powierzchnia jest następnie płukana w NH_4Cl co powoduje usunięcie większej części HA z powierzchni tytanu. Niewielka jego ilość pozostaje jednak na powierzchni poprawiając wgajanie implantu (48).

Powierzchnia poddana obróbce strumieniowo-ściernej i wytrawiana jest wstępnie piaskowana a następnie wytrawiana podobnie jak powierzchnie typu DE. Piaskowanie może być przeprowadzone za pomocą Al_2O_3 (25 – 50 μm), TiO_2 lub fosforanu wapnia. Dzięki procesowi wytrawiania dochodzi do usunięcia pozostałości krzemu z powierzchni tytanu, który to według niektórych autorów upośledza osteointegrację. Powierzchnia ta charakteryzuje się również specyficzną mikrotopografią podobnie jak powierzchnie typu DE. Jest to powierzchnia izotropowa. W mikroskopie elektronowym można zaobserwować szerokie kratery o średnicy 20 - 40 μm powstałe w wyniku piaskowania, a wewnątrz nich obecne są niewielkie dołki o średnicy 0,5 - 3 μm powstałe w wyniku trawienia. Chropowatość tego typu wszczepów jest większa niż powierzchni typu DE i maszynowych i wynosi około R_a 1 - 3 μm ; S_a 0,6 - 0,94 μm (48).

Modyfikacje powierzchni według jej chropowatości można podzielić na 3 grupy: makro, mikro i nanochropowate. Makrochropowatość mieści się w granicach milimetrów do dziesiątek mikrometrów. Dotyczy geometrii implantów, ich gwintów i makroporowatej modyfikacji powierzchni dającej chropowatość ponad 10 μm . Tego typu porowatość zapewne interlocking między kością a implantem zapewniając stabilizację pierwotną, ma również wpływ na długoczasową mechaniczną stabilność. Może ona również sprzyjać periimplantitis a także uwalnianiu jonów (20).

Mikrochropowatość powierzchni w mieści się w granicach 1-10 μm . Maksymalizuje interlocking przy zmniejszonym ryzyku periimplantitis i uwalnianiu jonów (szczególnie przy umiarkowanej chropowatości rzędu 1-2 μm) (20). Wpływa na odpowiedź tkanki kostnej na powierzchnię implantu. Uzyskiwana jest na drodze modyfikowania powierzchni implantu metodami addycyjnymi i ablacyjnymi przytoczonymi powyżej. Modyfikacje te zwiększają/rozwijają powierzchnię implantu.

Nanochropowatość powierzchni dotyczy wartości poniżej 1 μm . Wpływa na wczesną odpowiedź kostną. Jest ona istotna dla adsorpcji białek, adhezji osteoblastów a więc ma wpływ na tempo osteointegracji (20). Ostatnie badania wykazały, że powierzchnia o nanometrowych cechach struktury wykazuje dodatkowe efekty biologiczne zarówno *in vitro* jak i *in vivo* jest to między innymi efekt scalania, który ultrastrukturalnie może być określony jako „bonding” wiązanie w skali atomowej pomiędzy tlenkami i nanokryształami apatytu (16). Trudno jednakże rozróżnić wpływ mikro i nanochropowatości (18, 28).

2.4. Właściwości powierzchni implantów i ich wpływ na odpowiedź biologiczną

Według Albrektsonna na przebieg procesu osteointegracji mają wpływ takie czynniki jak powierzchnia implantu, technika zabiegu, łożo kostne, kształt implantu, biokompatybilność implantu oraz warunki obciążenia (11). Właściwości powierzchni mogą być podzielone na właściwości fizyczne i chemiczne. Wśród właściwości fizycznych można wyróżnić chropowatość powierzchni, topografię, energię powierzchniową, polarność, zwilżalność. Właściwości chemiczne wiążą się ze składem chemicznym powierzchni wszczepu który jest z kolei czynnikiem determinującym energię powierzchniową, polarność, zwilżalność i potencjał zeta (50). Istnieje więc znacząca zależność między fizycznymi i chemicznymi

właściami powierzchni. Ponadto obróbka powierzchni skutkująca zmianą właściwości fizycznych pociąga za sobą również zmianę właściwości chemicznych powierzchni (51).

Wszczerp oddziałuje na otaczające tkanki poprzez swoją powierzchnię. Oddziaływanie to można podzielić na oddziaływanie wczesne związane z interakcją płynów biologicznych z powierzchnią implantu. Ta interakcja jest często mediowana przez proteiny zaabsorbowane z płynów biologicznych. Cechy powierzchni dotyczące jej chropowatości, topografii i chemii powierzchni są następnie „tłumaczone” przez warstwę protein na informacje która jest zrozumiała dla komórek (51). Innym rodzajem oddziaływania pomiędzy wszczepem a tkanką jest oddziaływanie późne związane z mineralizacją przebiegającą na powierzchni wszczepu (17).

Istnieje szereg parametrów określających topografię powierzchni. Mogą to być parametry spektralne, fraktalne, amplitudy i szereg innych. Niestety żaden z nich nie określa powierzchni w sposób kompletny i skończony jak również nie wszystkie wpływają na biologiczną czy fizyczną reakcję na daną powierzchnię (52). Topografia powierzchni uzyskana w wyniku jej modyfikacji w procesie obróbki wpływa na odpowiedź komórkową a w szczególności na adhezję komórek, ma wpływ na ułożenie komórek, proliferację, rozprzestrzenianie, ich żywotność, morfologię i różnicowanie (31, 32, 46, 53, 54). Właściwości powierzchni wpływają również na zorientowanie komórek i ich ułożenie na powierzchni materiału. Na powierzchniach gładkich komórki układają się w sposób przypadkowy, nie zorientowany. W przypadku gdy na powierzchni obecne są bruzdy wówczas osteoblasty układają się zgodnie z ich przebiegiem. Orientacja komórek zgodnie z przebiegiem bruzd związana jest z tzw fenomenem prowadzenia kontaktowego (contact guidance phenomenon) (53). Istotna jest również wielkość bruzd, osteoblasty nie reagują na bruzdy o głębokości $0,5\mu\text{m}$ natomiast układają się zgodnie z przebiegiem bruzd o głębokości $5\mu\text{m}$. (55). Istotna jest również szerokość bruzd. Przy bruzdach szerokości $10\mu\text{m}$ osteoblasty

charakteryzują się większą żywotnością. Tak więc w przypadku powierzchni na której obecne są bruzdy wpływ na reakcje komórek ma zarówno ich głębokość, szerokość jak i mikrotopografia ich wnętrza (33, 53).

Komórki reagują na organizację powierzchni. Dowiedziono, że organizacja powierzchni zarówno w skali mikro jak i w skali nano wpływa na reakcje komórek. Dowiedziono również, że komórki preferują powierzchnię o relatywnie nieuporządkowanej topografii (56).

Powierzchnia wpływa na morfologię komórek. Te hodowane na powierzchniach gładkich charakteryzują się płaskim kształtem podczas gdy na powierzchniach umiarkowanie i intensywnie chropowatych są bardziej kuboidalne (54).

Nierówności powierzchni są istotą jej chropowatości. Chropowatość należy postrzegać zarówno w aspekcie wysokości jak i orientacji i organizacji powierzchni (33). W przypadku wysokości istotna jest skala wielkości chropowatości powierzchni. Wennerberg dzieli powierzchnie na gładkie, nieznacznie chropowate, umiarkowanie chropowate i chropowate (18). W ocenie wpływu wielkości chropowatości na reakcje komórkową ważna jest natomiast relacja skali chropowatości do wielkości pojedynczego osteoblastu. Powierzchnie preferowane przez te komórki to takie chropowate powierzchnie, które jednakże posiadają płaskie powierzchnie wielkości komórek zapewniające warunki do ich adhezji (18, 53). Makrochropowatość natomiast pozwala zakotwiczyć mechanicznie implant w kości natomiast nie jest identyfikowana przez komórki a więc nie ogranicza ich adhezji i rozprzestrzeniania (50). Z kolei większa gęstość nieregularności utrudnia proliferację i rozprzestrzenianie się komórek (46). Odnotowano, że osteoblasty rozprzestrzeniają się bardziej przylegając do powierzchni mniej chropowatej w porównaniu z powierzchnią bardziej chropowatą (32).

Aktywność fosfatazy alkalicznej jest wskaźnikiem różnicowania osteogenicznego, formowania i mineralizacji kości. Szereg badań potwierdza wpływ chropowatości powierzchni na aktywność fosfatazy alkalicznej (57, 58, 59, 60, 61). Oceniając aktywność

fosfatazy alkalicznej osteoblastów hodowanych na różnych powierzchniach odnotowuje się jej zwiększenie w przypadku prowadzenia hodowli na powierzchniach bardziej chropowatych (32, 62). Aktywność fosfatazy alkalicznej z kolei jako parametru oceny długoczasowej adhezji ludzkich osteoblastów do powierzchni tytanu o różnych chropowatościach w korelacji z parametrem organizacji powierzchni wskazuje, że ludzkie osteoblasty są bardziej wrażliwe na organizację i morfologię chropowatości niż na jej amplitudę (33).

Chropowatość powierzchni istotnie zwiększa również adhezję osteoblastów a także zapewnia dobry tzw. Interlocking implantu dzięki zarówno zwiększeniu powierzchni kontaktu między powierzchnią implantu a kością a także biomechanicznej integracji z kością (53, 63). Chropowatość powierzchni wpływa również na rodzaj komórek obecnych na powierzchni wgajającego się implantu. Fibroblasty mają tendencję do kolonizowania powierzchni gładszych, podczas gdy osteoblasty częściej występują na powierzchniach chropowatych. (64). Tak więc chropowatość istotnie wpływa na adhezję, proliferację i różnicowanie komórek chociaż czasami ten wpływ jest niezauważalny (65). Według najnowszych badań z kolei wpływ chropowatości powierzchni na adhezję komórek jest wtórny w stosunku do energii powierzchniowej szczególnie w przypadku metali które są materiałami o wysokiej energii powierzchniowej (53).

Osteoblasty są zdolne również rozróżnić i reagować na różnice w składzie chemicznym powierzchni (53). W przypadku materiałów przewidzianych w przyszłości jako materiały implantacyjne wprowadzane do tkanki kostnej powierzchnia często wzbogacona jest w wapń, fosfor, magnez czy siarkę. Taka modyfikacja umożliwia powstanie biochemicznego połączenia pomiędzy wszczepem a tkanką co skutkuje szybszą i intensywniejszą osteointegracją szczególnie we wczesnej fazie wgajania (53). Związki fosforanu wapnia, szczególnie HA, mają zdolność adsorpcji dużych ilości fibronektyny i vitronektyny co umożliwia intensyfikację procesu adhezji osteoblastów. Ponadto materiały ceramiczne takie

jak BCP czy HA mają zdolność rozpuszczania się w płynach tkankowych, dochodzi wówczas do wymiany jonów między materiałem a tkanką. Między innymi przy udziale rozpuszczonych składników materiałów ceramicznych dochodzi do precypitacji apatyty na powierzchni materiału a więc mineralizacji tkanki kostnej. Dodatnio naładowane jony wapnia działają jako jądra krystalizacji dla apatyty poprzez przyłączanie ujemnie naładowanych $(\text{PO}_4)^{3-}$ i $(\text{CO}_3)^{2-}$ i w ten sposób biorą udział w formowaniu wzbogaconej w wapń i fosfor warstwy powierzchniowej, która następnie krystalizuje w kościopodobny apatyt (66). Ponadto przypuszcza się, że właściwości osteoindukcyjne BCP i HA związane są z faktem, że procesowi precypitacji apatyty towarzyszy precypitacja z płynów ustrojowych czynników wzrostu takich jak białka morfogenetyczne kości, które wpływają na różnicowanie się komórek w kierunku osteoblastów (53, 67). Obecność wapnia i fosforu w wymiarze komórkowym natomiast, wpływa na zwiększenie proliferacji i żywotności osteoblastów hodowanych na tak modyfikowanych materiałach, co zwiększa biokompatybilność tych materiałów (66).

Różnice składu chemicznego materiałów determinują również takie parametry jak energia powierzchniowa, polarność, zwilżalność oraz potencjał zeta, a w konsekwencji wpływają również na interakcje komórek z materiałem.

Proste grupy hydroksylowe zdają się sprzyjać powstawaniu zarodków krystalizacji apatyty i krystalizacji bioceramiki. Ta powierzchniowa warstwa jest wysoko uwodniona i umożliwia utworzenie warstwy, której struktura jest porównywalna do hydrożelu (51). Obecność grup funkcyjnych zawierających tlen takich jak grupy karbonylowe, karboksylowe i estrowe zwiększają zwilżalność i polarność powierzchni co ułatwia adsorpcję białek mediujących adhezję między innymi fibronektyny, jak również białek zewnątrzkomórkowego matriksu, co w konsekwencji wpływa na zwiększoną adhezję komórek. Ponadto powierzchnie hydrofilne, czyli bogate w grupy tlenowe, zapewniają takie przestrzenne rozmieszczenie

zaadsorbowanych białek, które dodatkowo sprzyjają łatwiejszej adhezji komórek. Z kolei mniejsza ilość grup tlenowych zmienia właściwości powierzchni w kierunku bardziej hydrofobowych co z kolei stymuluje adsorpcję nie adhezyjnych cząsteczek białkowych takich jak albuminy. Właściwości hydrofobowe zwiększają się również wraz ze wzrostem zawartości na powierzchni materiału wodorowęglanów (46, 50, 53).

Adhezja komórkowa przebiega łatwiej na powierzchniach o ładunku dodatnim. Związane jest to z faktem, że molekuly sprzyjające adhezji komórek mają ładunek ujemny. Dodatnio naładowane grupy aminowe NH_4^+ sprzyjają więc adhezji komórek (50). Ujemny ładunek powierzchni związany z obecnością takich grup funkcyjnych jak grupy karboksylowe $-\text{COOH}$ oraz grupy siarkowe upośledza zarówno adhezję komórka-materiał jak i adhezję komórek do siebie wzajemnie (50). Z kolei Anselme podaje, że adsorpcje białek poprawia ładunek ujemny (53).

Również energia powierzchniowa wpływa na adhezję, rozprzestrzenianie i proliferacje komórek. Fibroblasty najintensywniej rozprzestrzeniają się na powierzchniach o umiarkowanej energii powierzchniowej. Powierzchnie o wyższej energii powierzchniowej zapewniają bliższą adhezję tkankową (53).

Na różnicowanie osteoblastów z kolei wpływa potencjał zeta czyli potencjał elektryczny, który istnieje na granicy faz (adsorpcyjnej i dyfuzyjnej) cząsteczki, która znajduje się w małej odległości od powierzchni (53).

Reakcja komórek na powierzchnie zależy nie tylko od jej parametrów topograficznych czy chemicznych ale również od fenotypu komórkowego. Odmierna reakcja różnego rodzaju komórek zależy nie tylko od ich pochodzenia ale i od różnic w ich wielkości czy morfologii (53).

Biologiczny efekt obecności glinu na powierzchni tytanu nadal pozostaje kontrowersyjny. Udowodniono upośledzenie gojenia kości w okolicy implantów tytanowych piaskowanych

glinem co wiązano z kompetycyjnym wiązaniem jonów glinu i wapnia (68, 69, 70, 71, 72). Z kolei w innej publikacji w badaniach *in vitro* z użyciem osteoblastów nie stwierdzono negatywnego oddziaływania pozostałych po procesie piaskowania cząsteczek glinu (73). Negatywnego efektu glinu nie odnotowano również w odniesieniu do przebiegu osteointegracji (74). Również Wennerberg nie stwierdziła istotnych statystycznie różnic współczynnika BIC (bone to implant contact) pomiędzy implantami o powierzchni maszynowej i implantami o powierzchni piaskowanej tlenkiem glinu (75). W związku z kontrowersjami dotyczącymi tlenku glinu często jako materiału ściernego w procesie piaskowania używa się związków fosforanu wapnia (20, 76, 77). Inną metodą na ograniczenie bądź eliminację glinu jest trawienie powierzchni implantów prowadzone po procesie piaskowania. Z tego powodu często te dwie metody obróbki są łączone (51).

3. Cel pracy

Celem badań była ocena przebiegu procesu osteointegracji na różnie modyfikowanych powierzchniach tytanu.

Wyodrębniono szczegółowe cele pracy:

1. Ocena żywotności komórek
2. Ocena stężenia białka
3. Ocena aktywności fosfatazy alkalicznej
4. Ocena stężenia prostaglandyny E2
5. Ocena wzrostu komórek w kondycjonowanym medium
6. Analiza obrazów SEM hodowli na badanych powierzchniach

4. Materiał badawczy i metodyka badań

4.1. Materiał badawczy

4.1.1. Badania wstępne

Badania wstępne dotyczyły opracowaniu procedury przygotowania preparatów histologicznych przekroju połączenia implantu z kością mającej służyć do oceny osteointegracji w dalszych etapach. Były one prowadzone w Katedrze i Zakładzie Histologii i Embriologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Badania prowadzono za zgodą Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach, Katedry Fizjologii i Biochemii Zwierząt, Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. Badania prowadzono na 20 królikach Białych Nowozelandzkich, były to dorosłe samice o wadze około 4kg i w wieku 6 miesięcy. Celem opracowania procedury wykorzystano jedno zwierzę.

Zwierzętom wszczepiono wykonane w wytwórni implantów Osteoplant tytanowe wszczepy śródkostne o średnicy 4mm i długości 7mm Ryc. 4.1. Po okresie wgajania trwającym 3 tygodnie implanty wraz z otaczającą tkanką kostną pobierane były przy pomocy trepanu kostnego. Zabiegi te prowadzono w Katedrze i Zakładzie Farmacji Klinicznej i Biofarmacji Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu a także Zakładzie Anestezjologii Doświadczalnej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu.



Ryc. 4.1. Tytanowy wszczep śródkostny

4.1.2. Badania zasadnicze

Do badań z zastosowaniem hodowli ludzkich osteoblastów użyto 280 dysków o wymiarach 8mm średnicy i 1mm grubości wykonanych z komercyjnie czystego tytanu klasy 4 b Ryc. 4.2. Skład chemiczny tytanu podany przez producenta stanowił: H – 54 ppm%, O – 0,285%, C – 0,01%, Fe – 0,14%, N – 0,007%, Ti – pozostała część. Powierzchnia dysków została zmodyfikowana metodami chemomechanicznymi.



Ryc. 4.2. Materiał badawczy – dyski tytanowe o średnicy 8mm i grubości 1mm

Do badań użyto 7 różnych rodzajów dysków po 40 sztuk z każdego rodzaju:

- dyski tytanowe o powierzchni maszynowej - MA
- dyski tytanowe o powierzchni piaskowanej Al_2O_3 - Al_2O_3
- dyski tytanowe o powierzchni piaskowanej Al_2O_3 i trawionej mieszaniną kwasów HCl/H_2SO_4 - Al_2O_3 DE
- dyski tytanowe piaskowane mieszaniną HA/TCP - HA
- dyski tytanowe piaskowane mieszaniną HA/TCP i trawione mieszaniną kwasów HCl/H_2SO_4 - HA DE
- dyski tytanowe piaskowane mieszaniną synteryzowanego HA/TCP - HAS
- dyski tytanowe piaskowane mieszaniną synteryzowanego HA/TCP i trawione mieszaniną kwasów HCl/H_2SO_4 - HAS DE

Dyski zostały przygotowane w Wytwórni Implantów Osteoplant w Poznaniu. Były one frezowane z prętów tytanu. Tak uzyskana była powierzchnia maszynowa. Po procesie frezowania dyski przekazano do procesu mycia i sterylizacji.

Piaskowanie prowadzono Al_2O_3 , lub mieszaniną HA/TCP poddaną procesowi syntetyzacji oraz nie syntetyzowaną.

Proszek Al_2O_3 składał się z ziaren o wielkości $53\pm 75\ \mu\text{m}$. Jego skład chemiczny stanowił w 98,5% Al_2O_3 z dodatkiem 0,180% SiO_2 , 0,010% TiO_2 , 0,007% Fe_2O_3 i 0,001% CaO . Mieszanina HA/TCP składała się z ziaren o wielkości $< 300\ \mu\text{m}$. Jej skład chemicznym stanowił $70\pm 5\%$ HA oraz $30\pm 5\%$ TCP a także śladowe ilości innych związków z czego w największej ilości: Na 10 000ppm, Mg 9000 ppm. Synteryzacja mieszaniny HA/TCP prowadzona była w temperaturze $1320\ ^\circ\text{C}$

Piaskowanie powierzchni próbek prowadzone było pod ciśnieniem 6 atmosfer.

Po przeprowadzeniu procesu piaskowania dyski przekazano do procesu mycia i sterylizacji. Proces ten prowadzony był zgodnie z procedurą stosowaną przy komercyjnie dostępnych implantach. Mycie prowadzone było w myjkach ultradźwiękowych w środku powierzchniowo czynnym przez 15 min w temperaturze $55\ ^\circ\text{C}$, następnie w 2-propranolu przez 15 minut w temperaturze $22\ ^\circ\text{C}$, w środku dezynfekcyjnym przez 15 minut w temperaturze $22\ ^\circ\text{C}$ oraz dwukrotnie w wodzie destylowanej przez 15 minut w temperaturze $55\ ^\circ\text{C}$. Po procesie mycia dyski suszono w temperaturze $60\ ^\circ\text{C}$ przez 60 minut.

Dyski o powierzchni trawionej zostały po procesie frezowania i piaskowania umyte zgodnie z powyższą procedurą. Proces trawienia przeprowadzony został zgodnie ze schematem zastosowanych w badaniach dr. Barbary Sikorskiej (78). Dyski płukano 7 minut w acetonie, następnie 3,5 minuty w wodzie destylowanej. Płukanie prowadzono w płuczce ultradźwiękowej. Dyski umieszczano w szklanym naczyniu w acetonie lub wodzie destylowanej a następnie naczynia z dyskami umieszczano w wodzie w płuczce i włączano proces mycia. Dyski pozostawiano do samoistnego wysuszenia przez 1 godzinę. Trawiono je następnie w temperaturze pokojowej przez okres 10 min w mieszaninie 36% HCl /96% H_2SO_4 (1:6). Dyski następnie płukano 7 minut w acetonie, następnie 3,5 minuty w wodzie destylowanej a następnie pozostawiano do samoistnego wysuszenia przez 2 godziny. Tak przygotowane dyski przekazano następnie do procesu mycia i sterylizacji.

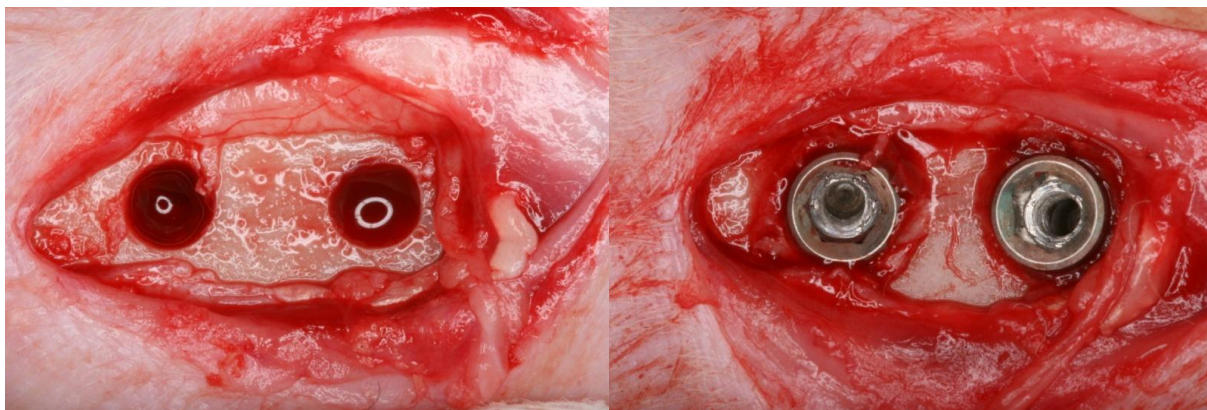
Po modyfikacji powierzchni i poddaniu dysków procesowi mycia były one poddane procesowi sterylizacji metodą radiacyjną za pomocą akceleratora elektronów. Dawka promieniowania wynosiła 25 kGy.

Dodatkowo jako materiał referencyjny użyty został Thermanox - film poliestrowy o modyfikowanej powierzchni hydrofilnej, adhezyjnej dla komórek (Thermo Scientific, Dania).

4.2. Metodyka badań

4.2.1. Badania wstępne

Zabieg wszczepienia implantów królikom przeprowadzany był w znieczuleniu ogólnym: Ketamina 50mg/kg m.c. i.m., Xylozyna 10mg/kg m.c. i.m. Dodatkowo podawano znieczulenie miejscowe nasiękowo w miejscu zabiegu 1ml lignocaina + noradrenalina 1:10.000. Podczas zabiegu podawany był również tlen medyczny przez sondę doustną. Po preparacji warstwowej odsłaniano guzowatość kości piszczelowej na jej powierzchni przednio-przyśrodkowej w części przynasady bliższej. Po wypreparowaniu w każdej piszczeli dwóch łoży kostnych w odległości 10mm od siebie wprowadzano w nie implanty Ryc. 4.3, Ryc. 4.4. Wszczepy były wprowadzane przy użyciu klucza dynamometrycznego. Po wprowadzeniu śrub zaślepiających rany zszywano warstwowo przy użyciu szwów Dexon 4.0. Zwierzęta objęte zostały tygodniową opieką pozabiegową. 2 razy dziennie podawano domięśniowo Cefuroxym w dawce 20mg/kg m.c a także stosowano na rany Neomycynę w postaci aerozolu. Celem zniesienia bólu pooperacyjnego podawano 2 razy dziennie domięśniowo Ketonal w dawce 1mg/kg m.c.



Ryc. 4.3. Wypreparowane łoża kostne

Ryc. 4.4. Wprowadzone wszczepy

Po upływie czasu wgajania wynoszącego 3 tygodnie przeprowadzano kolejny zabieg. Króliki były usypiane poprzez podanie dożylne do żyły brzeżnej ucha preparatu Morbital w dawce 1ml/kg m. c.. Implanty zostały odsłonięte i przy użyciu trepanu wycięte wraz z otaczającą je tkanka kostną Ryc. 4.5. Ryc. 4.6.

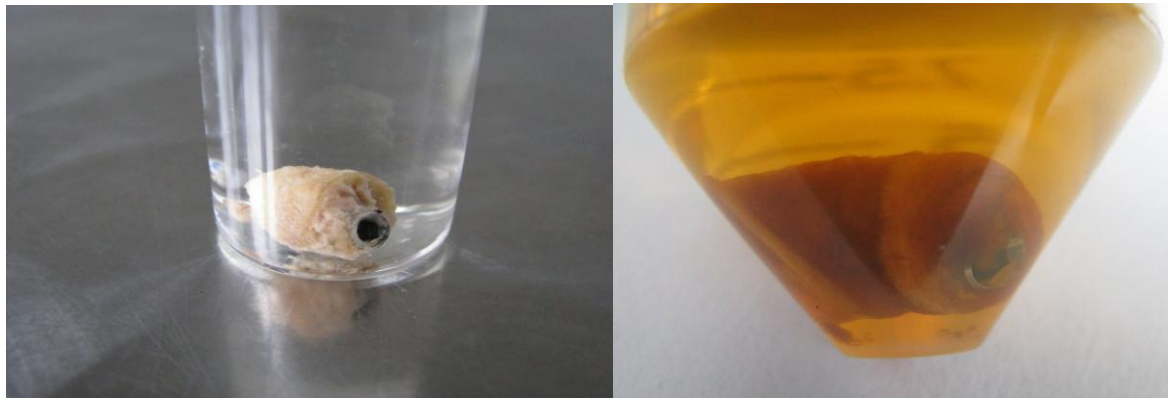


Ryc. 4.5. Odsłonięte implanty

Ryc. 4.6. Preparacja segmentów kostnych

Pobrany materiał utrwalono w 2.5% roztworze glutaraldehydu w 0.1M buforze fosforanowym o pH 7.4 Ryc. 4.7. Następnie materiał odwadniano w szeregu alkoholi o wzrastającym stężeniu (70%, 90%, 95% i 100%) i w acetonie. W każdym etapie odwadniania czas inkubacji uzależniony był od wielkości preparatu i trwał około 4 dni. Inkubację materiału w mieszaninie aceton/Epon a następnie w czystym Eponie przeprowadzano w temperaturze 4°C przez około 4 dni w każdym etapie. Bloczki implant-

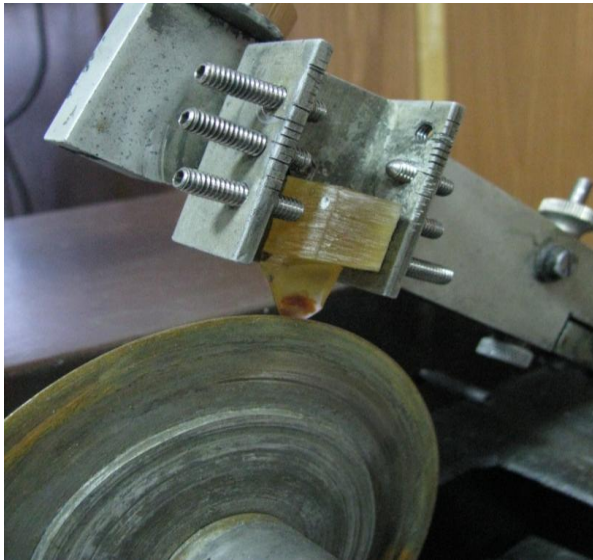
kość zatopiono w żywicy epoksydowej Epon Ryc. 4.8. Polimeryzację materiału przeprowadzono w kilku etapach, wstępnie w temperaturze 4°C przez 2 dni i kolejno jedną dobę w temperaturze pokojowej, następnie jedną dobę w 40°C i dwie doby w 60°C.



Ryc. 4.7. Utrwalony segment kostny

Ryc. 4.8. Segment kostny zatopiony w Eponie

Krojenie bloczków implant–kość przeprowadzono przy użyciu precyzyjnej przecinarki wolnoobrotowej Isomet 11-1180 Buehler, stosując tarczę o grubości 100 μm zawierającą ziarna diamentu Ryc. 4.9. Bloczki były krojone wzdłuż długiej osi implantu. Otrzymano preparaty o grubości 100 μm , które następnie szlifowano ręcznie papierami drobnoziarnistymi (typ 500-4000) do grubości ~ 30 μm Ryc. 4.10. Procedury cięcia i szlifowania preparatów prowadzono w Instytucie Inżynierii Materiałowej Zakładu Metaloznawstwa i Inżynierii Powierzchni Politechniki Poznańskiej. Skrawki zostały następnie umieszczone na standardowych szkiełkach podstawowych i przyklejone za pomocą kleju Pertex HistoLab. Część z nich została wybarwiona błękitem toluidyny.



*Ryc. 4.9. Bloczki kostne krojone wzdłuż
długiej osi implantu*



*Ryc. 4.10. Preparat zeszlifowany do grubości
~30 μm*

Analizę uzyskanych preparatów przeprowadzono przy użyciu mikroskopu świetlnego Olympus BX50 (Olympus, Japonia) przy powiększeniu 40x – 400x.

4.2.2. Badania zasadnicze

4.2.2.1. Badania topografii powierzchni

Celem zbadania topografii modyfikowanych powierzchni dysków tytanowych wykonano za pomocą techniki skaningowej mikroskopii elektronowej zdjęcia badanych powierzchni. Do badań użyto dysków o modyfikowanych powierzchniach poddanych procesowi mycia i sterylizacji. Obserwacje prowadzono przy użyciu mikroskopu skaningowego Zeiss EVO 25 (Carl Zeiss, Niemcy).

Obrazy SEM powstają poprzez skanowanie w próżni powierzchni próbki za pomocą wiązki elektronów o wysokiej energii która wzbudza sygnały rejestrowane następnie przez detektora i przetwarzane na obraz badanej próbki.

Technika skaningowej mikroskopii elektronowej pozwala na uzyskanie obrazów o dużej rozdzielczości i głębi obrazu co pozwala na analizę rozwiniętych powierzchni badanych próbek.

Obrazy wykonano w dwóch powiększeniach 3000x i 6000x.

4.2.3. Badania chropowatości powierzchni

Analiza chropowatości badanych próbek przeprowadzona była w sposób bezstykowy z użyciem mikroskopu interferencyjnego NT1100 wraz z oprogramowaniem Wyko Vision®32 (Veeco Instruments, USA). Zastosowano pięciokrotne powiększenie, badany obszar miał powierzchnię 0,9 x 1,2 mm. Powierzchnia każdej próbki została zmierzona w pięciu różnych miejscach. Wyniki przedstawiono jako średnią 5 uzyskanych wartości. Badania prowadzono w Instytucie Technologii Mechanicznej Zakładu Metrologii i Systemów Pomiarowych Politechniki Poznańskiej.

Mikroskop interferencyjny jest modyfikacją mikroskopu optycznego. Do badania materiału wykorzystuje się interferencję dwóch wiązek światła z których jedna odbija się od badanego przedmiotu, druga która nie odbija się od badanego przedmiotu stanowi wiązkę odniesienia. Interferencyjna metoda pomiaru nierówności powierzchni polega na analizie rozkładu fali świetlnej na badanej powierzchni. Metoda ta poza metodą konfokalnego laserowego profilometru skaningowego jest jedyną właściwą metodą oceny chropowatości implantów i materiałów planowanych jako implanty wg Wennerberg (79).

4.2.4. Badania składu chemicznego powierzchni

Celem zbadania składu chemicznego modyfikowanych powierzchni dysków tytanowych wykorzystano technikę spektroskopii z dyspersją energii promieniowania rentgenowskiego. Obserwacje prowadzono przy użyciu mikroanalizatora/detektora Quantax AXS (Bruker, Niemcy) współpracującego ze skaningowym mikroskopem elektronowym. Do badań użyto dysków o modyfikowanych powierzchniach poddanych procesowi mycia i sterylizacji.

Urządzenie to wykorzystuje technikę dyspersji energii promieniowania rentgenowskiego i działa na zasadzie detekcji wzbudzanego w próbce promieniowania rentgenowskiego. Technika ta pozwala na identyfikację składu pierwiastkowego badanego materiału. Jest ona bardzo czuła, pozwala wykryć pierwiastki przy stężeniach poniżej 0,1% co pozwala na ocenę zmian w składzie chemicznym powierzchni próbek poddanych procesom modyfikacji. Głębokość analizy sięga kilku mikrometrów (51).

4.2.5. Hodowla ludzkich osteoblastów linii NHOst (Lonza)

Hodowla komórek na powierzchniach próbek miała na celu ocenę reakcji osteoblastów na modyfikacje powierzchni planowanych docelowo jako powierzchnie wszczepów śródkostnych. Oceniano żywotność komórek, syntezę białka, aktywność fosfatazy alkalicznej, syntezę PGE₂ oraz reakcje komórek na kondycjonowane medium. Badano wpływ próbek oraz mediów hodowlanych na reakcje komórek tworząc warunki jak najbardziej odpowiadające tym panującym w organizmie.

Badania wykonano w Pracowni Hodowli Tkanek Kliniki Rozrodczości Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu.

Do badań użyto linii komórkowej ludzkich osteoblastów NHost (NHost-Osteoblasts OGM, cryo amp), medium hodowlanego, suplementów i czynników wzrostu i różnicowania (Osteoblast Basal Medium, Osteoblast Growth Medium SingleQuots, Differentiation SingleQuots) wyprodukowanych przez LONZA USA. Ludzkie osteoblasty dostarczone były w formie zamrożonej, w ilości $\geq 500,000$ komórek, w 1 ml. Medium hodowlane składało się z medium podstawowego (Osteoblast Basal Medium) oraz suplementów wzrostu (Osteoblast Growth Medium SingleQuots) w postaci osocza krwi cielęcej, kwasu askorbinowego oraz wodnego roztworu gentamycyny i amfoterycyny B. Czynniki wzrostu i różnicowania (Differentiation SingleQuots) indukujące różnicowanie i mineralizację osteoblastów stanowiły półbursztynian hydrokortyzonu oraz β gliceryno fosforan.

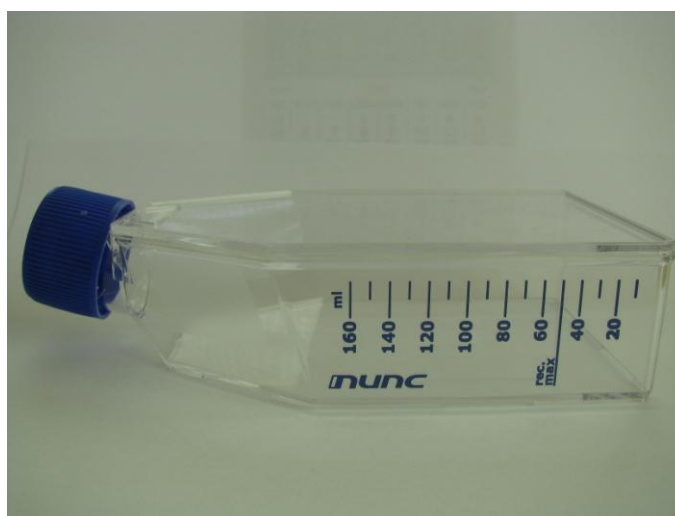


Ryc. 4.11. Probówka zawierająca zamrożone ludzkie osteoblasty

Przygotowanie hodowli komórkowej ludzkich osteoblastów

Pierwszym etapem przygotowania hodowli komórkowej ludzkich osteoblastów było przygotowanie pożywki do wzrostu. Do pożywki podstawowej (Osteoblast Basal Medium) podano suplementy (Osteoblast Growth Medium SingleQuots, Differentiation SingleQuots) i

umieszczono w sterylnych probówkach. Następnie przystąpiono do przygotowania inoculum. Do butelki hodowlanej NUNCLONE 25cm² (Roskilde, Dania) podano 5ml medium i po rozmrożeniu inoculum podano do niej rozbitą delikatnie pipetą zawiesinę. Hodowlę prowadzono w inkubatorze w temperaturze 37⁰C w atmosferze 5% CO₂. Kulturę prowadzono zmieniając codziennie pożywkę aż do pokrycia 80% powierzchni butelki monolayerem.



Ryc. 4.12. Butelka hodowlana NUNCLONE 25cm²

Pasażowanie do naczyń hodowlanych

Po uzyskaniu właściwego wzrostu inoculum, w celu pasażowania, odtrawiono komórki w według następującego schematu. Usunięto pożywkę z butelki hodowlanej i przepłukano monolayer 5ml HEPES-BSS (Lonza, USA) który następnie usunięto. Podano 2ml 0,25% Trypsyny/EDTA (Lonza, USA). Proces odtrawiania kontrolowano pod mikroskopem. Po 6 minutach uzyskano 90% odtrawionych komórek. Celem oderwania od podłoża pozostałych komórek naczyniem lekko uderzono o stół. Następnie podano 4ml roztworu neutralizującego trypsynę TNS (Lonza, USA). Uzyskaną zawiesinę komórkową przeniesiono do 15ml

próbówki, a butelkę przepłukano pozostałym buforem HEPES-BSS i popłuczyny dodano do próbówki. Zawiesinę komórkową następnie zwirowano z prędkością 220 x g przez 5 minut. Supernatant usunięto a uzyskany osad zawieszono w 2 ml świeżej pożywki.



Ryc. 4.13. 24 dołkowe naczynie hodowlane #144530 (Roskilde, Dania)

W 24 dołkowym naczyniu hodowlanym NUNC#144530 (Roskilde, Dania) umieszczono badane dyski. Po policzeniu komórek w komorze hematologicznej typu Neubauer'a (pola $0,04\text{mm}^2$ i $0,0025\text{mm}^2$, głębokość $0,1\text{mm}$) do każdego dołka podano po 4×10^4 komórek. Hodowlę prowadzono w inkubatorze w temperaturze 37°C w atmosferze $5\%\text{CO}_2$ i wilgotności 95% w objętości 1ml medium hodowlanego wymienianego co 24 godziny.

Testy właściwości biologicznych modyfikowanych powierzchni tytanu:

1. Ocena żywotności komórek
2. Ocena stężenia białka
3. Ocena aktywności fosfatazy alkalicznej
4. Ocena stężenia prostaglandyny E2
5. Ocena wzrostu komórek w długokondycjonowanym medium
6. Analiza obrazów SEM hodowli na insertach

4.2.5.1. Ocena żywotności komórek

Ocenę przeprowadzono z zastosowaniem testu MTS. Test ten jest testem biochemicznym mającym na celu ocenę aktywności metabolicznej komórek jak i ich degradacji. Polega on na bioredukcji przez dehydrogenazę mitochondrialną soli tetrazoliny (3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-5-(3-carboksymetoksyfenyl)-2-(4-sulfofenyl)-2H-tetrazolu) w obecności katalizatora pod postacią pośredniego akceptora elektronów - metasiarczanu fenazy (PMS). W wyniku tej reakcji powstaje barwny, rozpuszczalny w wodzie formazan - produkt aktywności mitochondrialnej żywych komórek. Ilość zsyntetyzowanego formazanu jest proporcjonalna do ilości żywych komórek oraz czasu inkubacji hodowli w MTS/PMS i odwzorowana jest w intensywności barwy roztworu. Pomiarów dokonuje się przy zastosowaniu spektrofotometru, maksimum absorpcji dla formazanu mieści się w granicach 490-500nm (80, 81, 82).

Do badania użyto po 6 próbek z każdego rodzaju modyfikacji powierzchni. Hodowlę prowadzono w 24 dołkowym naczyniu hodowlanym Multidish 24 #144530 (Roskilde, Dania) przez 24h, 3 dni, 7 dni i 14 dni codziennie zmieniając pożywkę. Po inkubacji 24 dołkowe płytki hodowlane z insertami były 3krotnie płukane świeżą pożywką. Kolejne testy MTS były prowadzone kolejno po 24h, 72h, 7 i 14 dniach na tych samych insertach. Bezpośrednio przed każdym badaniem przygotowywano roztwór MTS (Promega, USA) (20 obj.) i PMS (Promega USA) (1 obj.). Przygotowany roztwór podawano do medium w proporcji (1:10) a następnie inkubowano przez okres maksymalnie 60 minut w 37°C w atmosferze 5% CO₂. Co 15min. naczynia były lekko wstrząsane aby wymieszać barwny produkt reakcji i w celu kontroli stopnia zaawansowania reakcji aby nie doszło do wysycenia produktem. Otrzymany barwny roztwór przeniesiono do 96 dołkowej płytki ELISA #167008 TC MICROWELL NUNCLON (Roskilde, Dania). Zbadano absorpcję przy $\lambda=490\text{nm}$ przy użyciu spektrofotometru Dynex

MRX. (Dynex Technologies, USA). Następnie obliczono względny wskaźnik żywotności komórek (Relative Viability of Cells RVC) ze wzoru:

$$\text{RVC (\%)} = [(a-b) / (c-b)] \times 100;$$

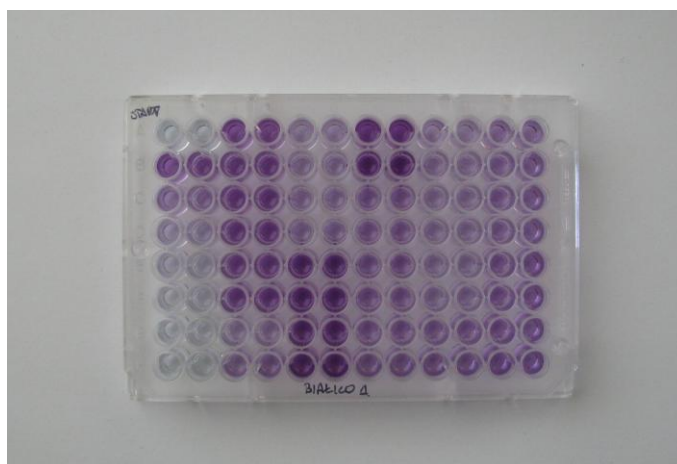
Gdzie a – wartość absorbancji próbki, b – absorbancja kontroli zerowej (reakcja bez komórek), c – absorbancja kontroli – Thermanox.

4.2.5.2. Ocena stężenia białka

Ocena zawartości białka w badanych próbkach pozwala na ocenę ilości namnożonych na badanym podłożu komórek. Zasada oceny stężenia białka w próbce polega na użyciu kwasu bis-cynchoninowego (BCA) jako odczynnika wykrywającego Cu^{+1} który powstaje gdy Cu^{+2} jest redukowane przez białko w środowisku zasadowym. Purpurowy produkt reakcji powstaje w wyniku tworzenia się kompleksów chelatowych dwóch cząsteczek BCA z jednym jonem miedzi (Cu^{+1}). Ten rozpuszczalny w wodzie kompleks wykazuje silną absorbancję przy długości fali 562nm, która jest zależna od wzrastającego stężenia białka (83).

Do badania użyto po 6 próbek z każdego rodzaju modyfikacji powierzchni. Hodowlę prowadzono w 24 dołkowych naczyniach hodowlanych Multidish 24 #144530 (Roskilde, Dania) codziennie zmieniając pożywkę. Hodowlę zakończono po 14 dniach. Do analizy stężenia białka użyto zestawu Micro BCA™ Protein Assay Kit (Thermo Scientific, USA). Warstwę komórek na insertach umieszczonych w 0,5ml podwójnie destylowanej wody poddano homogenacji poprzez 3-krotne zamrożenie w ciekłym azocie i odmrożenie w temperaturze pokojowej, poczym pozostałość zdrapano z insertu i dodano do zawiesiny w której odbywało się mrożenie próbek. Celem oceny stężenia białka w próbce przygotowano szereg dziewięciu rozcieńczeń albuminy wołowej (Sigma Aldrich, USA). Wykonano roztwór roboczy według instrukcji producenta zestawu. Na 96 dołkową płytkę ELISA #167008 TC

MICROWELL NUNCLON (Roksdile, Dania) podano po 150 μm każdej badanej próbki oraz każdego rozcieńczenia serum wołowego a następnie do każdego dołka podano 150 μl uzyskanej mieszaniny roztworu roboczego i inkubowano w 37°C przez okres 2 godzin. Po ochłodzeniu roztworu roboczego do temperatury pokojowej poddano analizie spektrofotometrycznej przy długości fali $\lambda=570\text{nm}$ przy użyciu Dynex MRX (Dynex Technologies USA). Odczyt wykonano wobec próby ślepej tzn. roztworu roboczego połączonego z podwójnie destylowaną wodą. Wykonano krzywą standardową odnosząc wyniki absorbancji rozcieńczeń albuminy wołowej w stosunku do oznaczonych wartości stężenia białka w $\mu\text{g/ml}$. Przy użyciu standardowej krzywej określono stężenie białka w badanych próbkach.



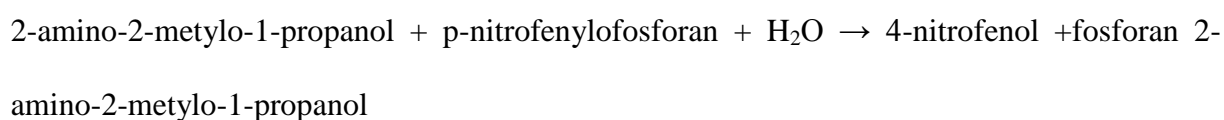
Ryc. 4.14. 96 dołkowa płytkę ELISA przygotowana do analizy spektrofotometrycznej zawartości białka

4.2.5.3. Ocena aktywności fosfatazy alkalicznej

Aktywność fosfatazy alkalicznej jest wskaźnikiem różnicowania osteogenicznych komórek, formowania kości i mineralizacji matriksu (84). Jest wczesnym markerem różnicowania i osiąga maksymalne wartości w momencie rozpoczęcia mineralizacji (85). Aktywność

fosfatazy alkalicznej wskazuje również na długoczasową adhezję osteoblastów do powierzchni badanej. Jest to marker związany z dojrzałymi komórkami osteoblastycznymi.

Fosfataza alkaliczna jest enzymem należącym do klasy hydrolaz czyli enzymów katalizujących reakcje rozbijania wiązań z udziałem wody. Katalizuje ona reakcje odszczepienia reszty fosforanowej od różnego typu związków. Aktywność fosfatazy alkalicznej można mierzyć ilością uwolnionego nieorganicznego fosforu lub ilością uwolnionej reszty organicznej estru fosforanowego, po inkubacji enzymu z substratem w określonych warunkach. Jej stężenie oznacza się spektrofotometrycznie na podstawie stężenia p-nitrofenolu (po zalkalizowaniu próbki), uwolnionego w wyniku enzymatycznej hydrolizy p-nitrofenylofosforanu przebiegającej wg wzoru:



Celem określenia jej aktywności należy ocenić jej stężenia względem stężenia białka w badanym materiale (32).

Do badania użyto po 6 próbek z każdego rodzaju modyfikacji powierzchni. Hodowlę prowadzono w 24 dołkowych naczyniach hodowlanym Multidish 24 #144530 (Roskilde, Dania) codziennie zmieniając pożywkę. Hodowlę zakończono po 14 dniach. Warstwę komórek na insercie umieszczonym w 0,5ml podwójnie destylowanej wody poddano homogenacji poprzez 3 krotne zamrożenie w ciekłym azocie i odmrożenie w temperaturze pokojowej, poczym pozostałość zdrapano z insertu i dodano do zawiesiny, w której odbywało się mrożenie próbki. Poziom białka w próbkach oznaczono za pomocą Micro BCA™ Protein Assay Kit (Thermo Scientific, USA). Następnie określono objętość, w której znajdowało się 5µg białka. Otrzymaną objętość każdej próbki dopełniono do 100µL wodą destylowaną. Na 96 dołkową płytkę ELISA #167008 TC MICROWELL NUNCLON (Roksdile, Dania) podano 50µL homogenatu i 125µL p-Nitrophenyl Phosphate Liquid

Substrate System #N7653 (Sigma Aldrich) w duplikacji. Płytkę inkubowano w temp. 37°C przez 120 min. Reakcję przerwano 50µL 0,3M NaOH i przy użyciu spektrofotometru Dynex MRX (Dynex Technologies USA) wykonano odczyt przy $\lambda=405\text{nm}$.

4.2.5.4. Ocena stężenia prostaglandyny E2

Prostaglandyna E2 (PGE2) należąca do grupy cytokin reguluje różnicowanie osteoblastów. Należy do grupy mediatorów związanych z regulacją metabolizmu kości. Jest to białko TGF- β i czynnik lokalny syntezowany przez osteoblasty odgrywający rolę w gojeniu i formowaniu kości. PGE2 w niższych stężeniach stymuluje aktywność osteoblastów natomiast w wyższych stężeniach hamuje działanie osteoblastów stymulując aktywność osteoklastów (86, 67).

Celem oceny stężenia prostaglandyny E2 wykonano test ELISA który polega na technice kompetencyjnego łączenia PGE2 we współzawodnictwie z PGE2 znakowaną peroksydazą chrzanową (HRP) do monoklonalnych przeciwciał o ograniczonej liczbie miejsc do wiązania osadzonych na płytce mikrofiltracyjnej. Pierwsza inkubacja odbywa się z PGE2. Ponieważ oba rodzaje antygenów-PGE2 współzawodniczą o wiązanie do przeciwciał, poziom sygnału jest proporcjonalny do udziału znakowanego PGE2 w mieszaninie reakcyjnej. Im więcej PGE2 w badanej próbce, tym poziom sygnału jest mniejszy, ponieważ mniejszy jest proporcjonalny udział znakowanego PGE2 w mieszaninie reakcyjnej. Druga inkubacja polega na wiązaniu awidyna - biotyna gdzie do biotynylowanej PGE2 jest przyłączany koniugat HRP-awidyna. Uzyskane po drugiej inkubacji połączenie biotyna - awidyna służy jako chemiczny łącznik pomiędzy PGE2 i HRP. Następnie następuje wypłukanie niezwiązanego materiału po czym podawany jest substrat dla HRP celem oznaczenia aktywności enzymatycznej związanego enzymu. Proces wybarwienia jest następnie blokowany i

mierzona jest absorbancja przy długości fali 450nm. Intensywność koloru jest związana ze stężeniem PGE2 w próbce.

Do badania użyto po 6 próbek z każdego rodzaju modyfikacji powierzchni. Hodowlę prowadzono w 24 dołkowych naczyniach hodowlanym Multidish 24 #144530 (Roskilde, Dania) codziennie zmieniając pożywkę. Hodowlę zakończono 14 dniach po założeniu. Podczas drugiego tygodnia komórki były hodowane w 0,5ml pożywki celem zwiększenia stężenia koncentracji prostaglandyny. Zebrano medium hodowlane. Ocenę stężenia PGE2 wykonano przy użyciu zestawu Parameter PGE2 Assay (R&D Systems). Test wykonano na supernatancie z hodowli komórkowej. Badane próbki trzykrotnie rozcieńczono wg schematu 150 µl próbki + 300 µl rozcieńczalnika kalibracyjnego RD5-56. Dodano 50 µl pierwotnego roztworu przeciwciał i inkubowano przez godzinę na wytrząsarce. Dodano 50 µl sprzężonego PGE2 i inkubowano 2 godziny na wytrząsarce. Czterokrotnie przepłukano w buforze płuczającym 400µl. Podano 200 µl roztworu substratu i inkubowano 30 min. Dodano 100 µl roztworu zatrzymującego. Kolor zmienił się z niebieskiego na żółty. Oceniono absorbancję za pomocą spektrofotometru Dynex MRX (Dynex Technologies, USA) przy długości fali 450 nm. Wykonano również pomiary dla próbek standardowych i kontroli. Utworzono standardową krzywą na podstawie średniej absorbancji dla pomiarów próbek standardowych. Oszacowano stężenie PGE2 w odniesieniu do średniej absorbancji z krzywej standardowej. Ponieważ próbki zostały rozcieńczone stężenie odczytane z krzywej standardowej zostało pomnożone przez wielokrotność rozcieńczenia.

4.2.5.5. Ocena wzrostu komórek w kondycjonowanym medium.

Ocena żywotności komórek w kondycjonowanym medium pozwala na dynamiczną analizę interakcji badanego materiału z medium hodowlanym naśladującym płyny ustrojowe. Metoda

ta pozwala prognozować jak zachowywać się będzie badany materiał przy dłuższym kontakcie z płynami ustrojowymi i jaki będzie miało to wpływ na odpowiedź biologiczną.

Badanie rozpoczęto od przygotowania kondycjonowanego medium. W tym celu przygotowano butelki hodowlane 25cm² Easy Flask NUNCLON D SI #156367 (Roksdile, Dania). Na dno ułożono 1 warstwę sterylnych kulek ZrO₂ o średnicy 2mm. Na kulkach umieszczono insert. Podano sterylnie 12ml niesuplementowanego medium Osteoblast Basal Medium. Układ wytrząsano 14 dni na wytrząsarce orbitalnej z szybkością 300 obrotów na minutę, w temperaturze 37⁰C. Równoległe taką samą procedurę prowadzono dla 12 ml medium nie zawierającego insertów – kontrola. Po 14 dniach zebrano medium, zwirowano przez okres 10 min z szybkością 3000 obrotów na minutę, przefiltrowano (0,2µm) a następnie dosuplementowano 10% FBS, 0,1% kwasu askorbinowego i 0,1% preparatu antybiotykowego GA 1000 (Lonza, USA). Przygotowano rozcieńczenia kondycjonowanego medium w świeżym medium o wartościach 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,0313 oraz 0,000.

Celem oceny reakcji osteoblastów na kondycjonowane medium założono hodowlę ludzkich osteoblastów NHOst podając po 3 x 10² komórek na dołek do 96 dołkowej płytki ELISA #167008 TC MICROWELL NUNCLON (Roksdile, Dania) według schematu:

Tabela II. Schemat rozcieńczeń kondycjonowanego medium

	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	
Blk	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,0313	0,000
Blk	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,0313	0,000
Blk	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,0313	0,000
Blk	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,0313	0,000
Blk	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,0313	0,000
[b]	[a]	[a]	[a]	[a]	[a]	[c]

Każde rozcieńczenie badane było 5 krotnie.

Pierwszy raz pożywkę z kondycjonowanym rozcieńczonym medium podano po 4h inkubacji hodowli w temperaturze 37⁰C w atmosferze 5% CO₂.

Pożywkę wymieniano codziennie z zachowaniem odpowiednich rozcieńczeń. Eksperyment zakończono po 7 dobach testem MTS.

Test MTS jest testem mającym na celu ocenę aktywności metabolicznej komórek jak i ich degradacji. Polega on na bioredukcji przez dehydrogenazę mitochondrialną soli tetrazoliny (3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-5-(3-carboksymetoksyfenyl)-2-(4-sulfofenyl)-2H-tetrazolu) w obecności katalizatora pod postacią pośredniego akceptora elektronów - metasiarczanu fenazyny (PMS). W wyniku tej reakcji powstaje barwny, rozpuszczalny w wodzie formazan - produkt aktywności mitochondrialnej żywych komórek. Ilość zsyntetyzowanego formazanu jest proporcjonalna do ilości żywych komórek oraz czasu inkubacji hodowli w MTS/PMS i odwzorowana jest w intensywności barwy roztworu. Pomiarów dokonuje się przy zastosowaniu spektrofotometru, maksimum absorpcji dla formazanu mieści się w granicach 490-500nm (80, 81, 82).

Obliczono względny wskaźnik żywotności komórek (Relative Viability of Cells - RVC) ze wzoru:

$$RVC (\%) = [(a-b) / (c-b)] \times 100;$$

gdzie a – wartość absorpcji próbek, b – absorpcja kontroli zerowej, c – absorpcja kontroli z niekondycjonowanym medium.

4.2.5.6. Analiza obrazów SEM hodowli badanych powierzchniach

Obrazy SEM insertów na których prowadzona była hodowla ludzkich osteoblastów pozwalają na ocenę morfologii komórek, ich interakcji z podłożem, rozmieszczenia, określenie stopnia pokrycia insertu przez komórki, obecności martwych komórek.

Po okresie hodowli 1, 3, 7 i 14 dni próbki zostały utrwalone przez okres 24h w 2% aldehydzie glutarowym w PBS, następnie odwodnione w szeregu alkoholi 30, 50, 70 i 96% oraz w alkoholu absolutnym po czym zostały przekazane do pracowni SEM gdzie były suszone w punkcie krytycznym i nasycone złotem.

Badania prowadzono w Wydziałowej Pracowni Mikroskopii Elektronowej i Konfokalnej Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

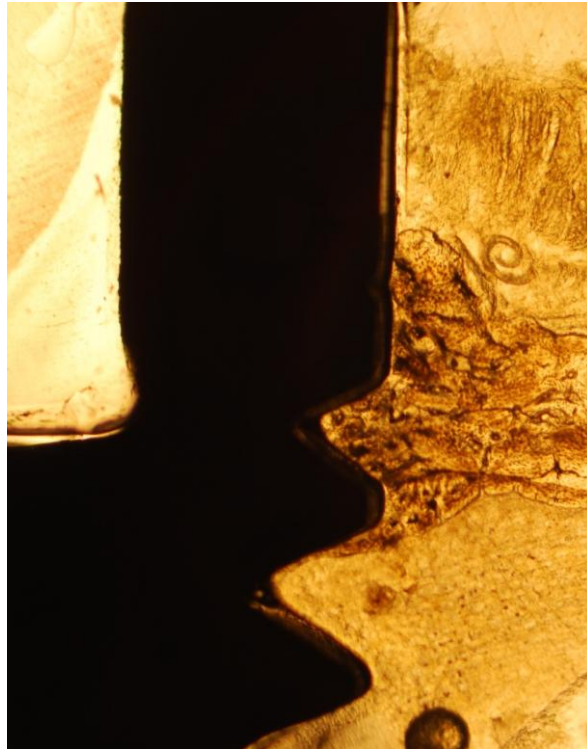
4.2.5.7. Analiza statystyczna

W celu oceny istotności różnic między badanymi grupami zastosowano jednosoczewkową analizę wariancji zarówno dla zmiennych niepowiązanych jak i powiązanych. W przypadku wykazania istotnych różnic, zastosowano test post-hoc Tukeya w celu wyznaczenia grup jednorodnych. Przed zastosowaniem analizy wariancji sprawdzono wymagane założenia to jest zgodność z rozkładem normalnym (test Shapiro-Wilka) oraz jednorodność wariancji (test Levene'a).

5. Wyniki badań i ich omówienie

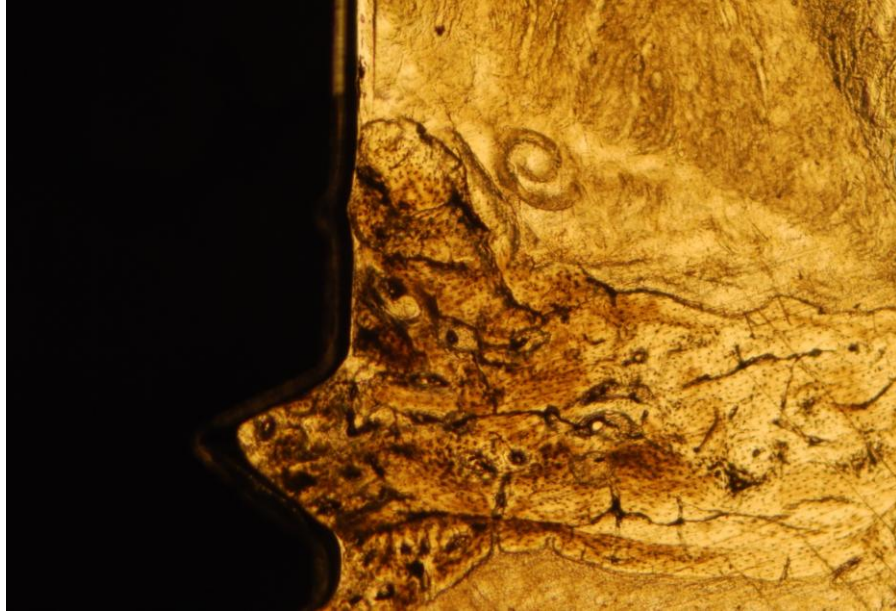
5.1. Badania wstępne

Obserwacja uzyskanych preparatów histologicznych przy użyciu mikroskopii świetlnej pozwoliła na ocenę połączenia pomiędzy tkanką kostną a wszczepionym implantem.



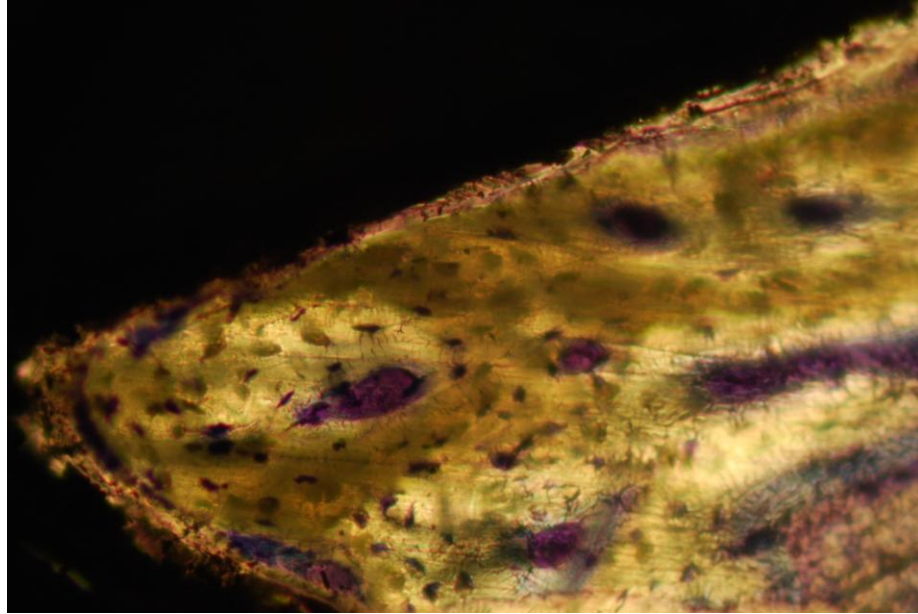
Ryc. 5.1 Obraz z mikroskopii świetlnej przekroju preparatu implant kość. Powiększenie 40x

Na rycinie 5.1 w powiększeniu 40 krotnym widoczny jest przekrój przez gwint zewnętrzny i gniazdo implantu, widoczna jest również tkanka kostna w bezpośrednim sąsiedztwie powierzchni wszczepu. W 100 krotnym powiększeniu uwagę zwraca dobra adhezja tkanki kostnej do powierzchni gwintu Ryc. 5.2



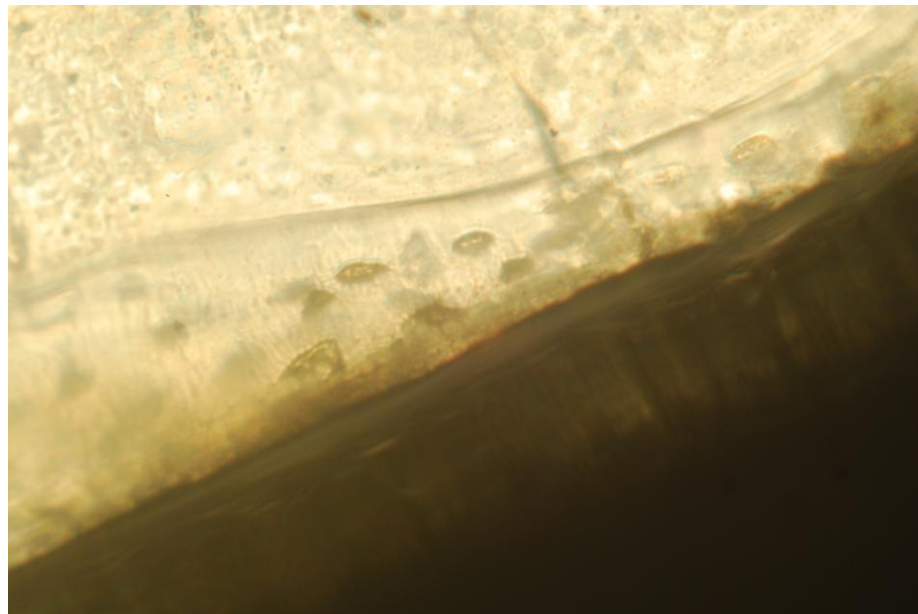
Ryc. 5.2 Obraz z mikroskopii świetlnej przekroju preparatu implant kość. Powiększenie 100x

Na preparatach wybarwianych błękitem toluidyny w powiększeniu 200 krotnym można obserwować kanały Haversa wybarwione na fioletowo, w ich otoczeniu jamki z osteocytami a także kanaliki łączące kanały Haversa z jamkami osteocytów. Uwagę zwraca warstwa osteoidu pomiędzy zorganizowaną tkanką kostną o powierzchnią tytanu. Ściśle przylega ona do powierzchni gwintu Ryc.5.3.



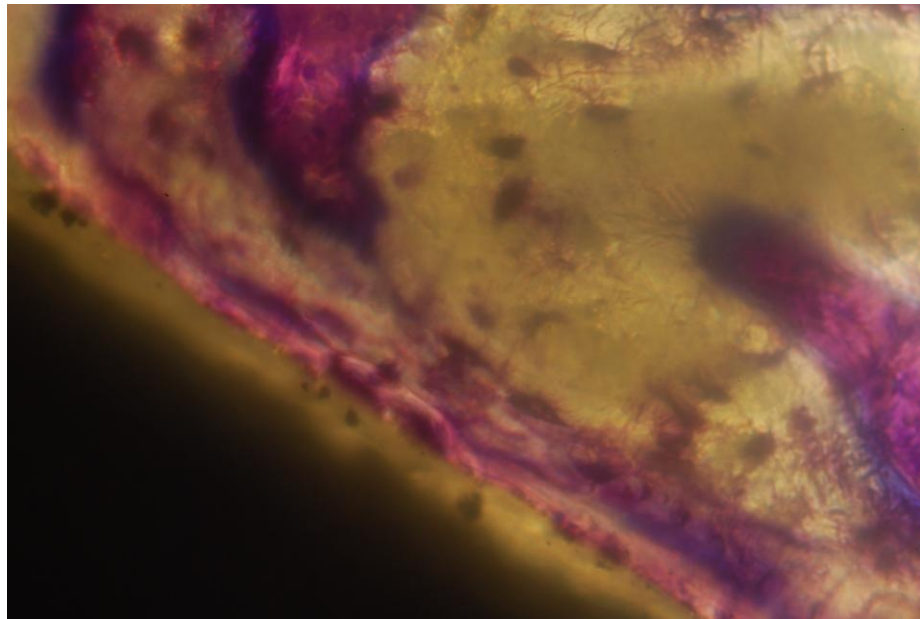
Ryc. 5.3 Obraz z mikroskopii świetlnej przekroju preparatu implant kość wybarwionego fioletem toluidyny. Powiększenie 200x

W powiększeniu 400 krotnym blisko powierzchni wszczepu obserwuje się osteoblasty, w wyższych warstwach natomiast osteocyty zamknięte w jamkach z promieniście rozchodzącymi się kanalikami Ryc. 5.4.



Ryc. 5.4. Obraz z mikroskopii świetlnej przekroju preparatu implant kość. Powiększenie 400x

Na preparacie barwionym, w tym samym powiększeniu widać wybarwione na fioletowo osteoblasty znajdujące się bezpośrednio na powierzchni tytanu Ryc.5.5.



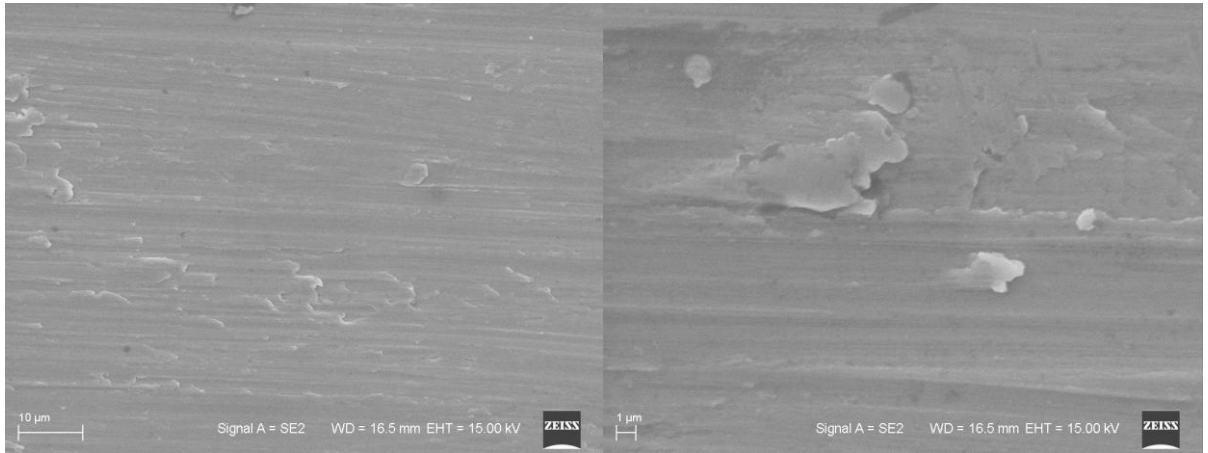
Ryc. 5.5. Obraz z mikroskopii świetlnej przekroju preparatu implant kość wybarwionego fioletem toluidyny. Powiększenie 400x

5.2. Badania zasadnicze

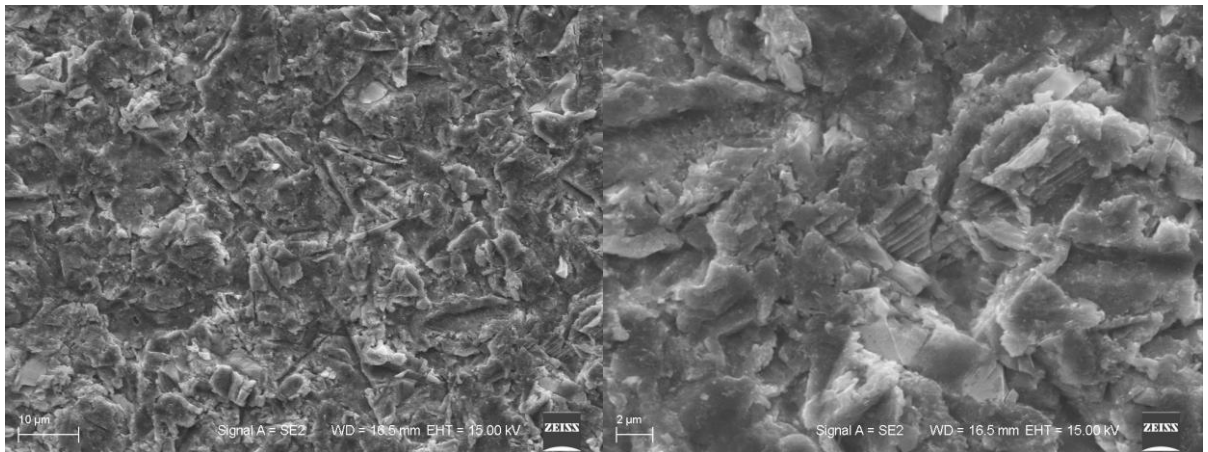
Poniżej przedstawiono wyniki badań powierzchni badanych materiałów a także odpowiedzi biologicznej osteoblastów.

5.3. Analiza topografii badanych powierzchni

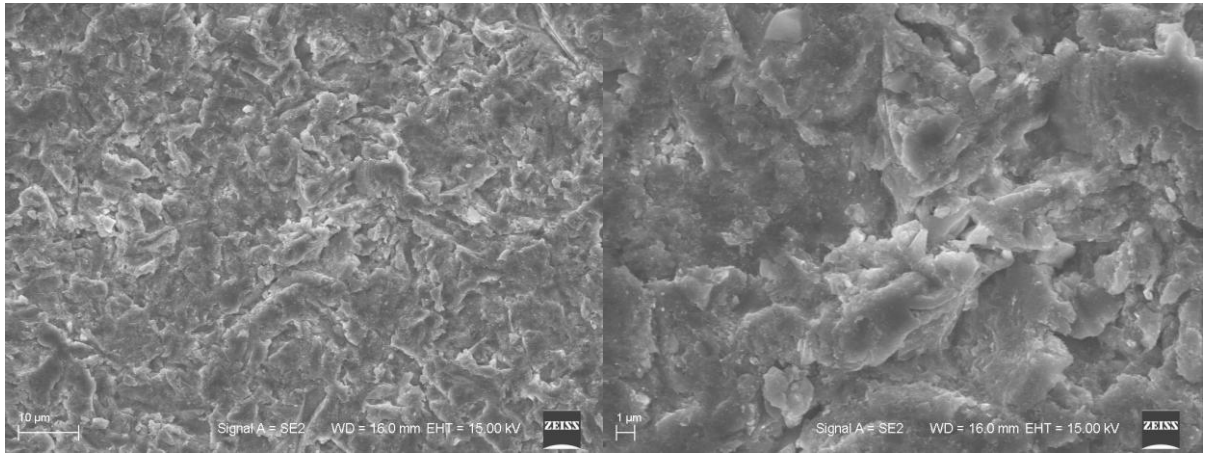
Obrazy powierzchni badanych materiałów wykonane przy użyciu skaningowego mikroskopu elektronowego przedstawiono na rycinach 5.6 – 5.12.



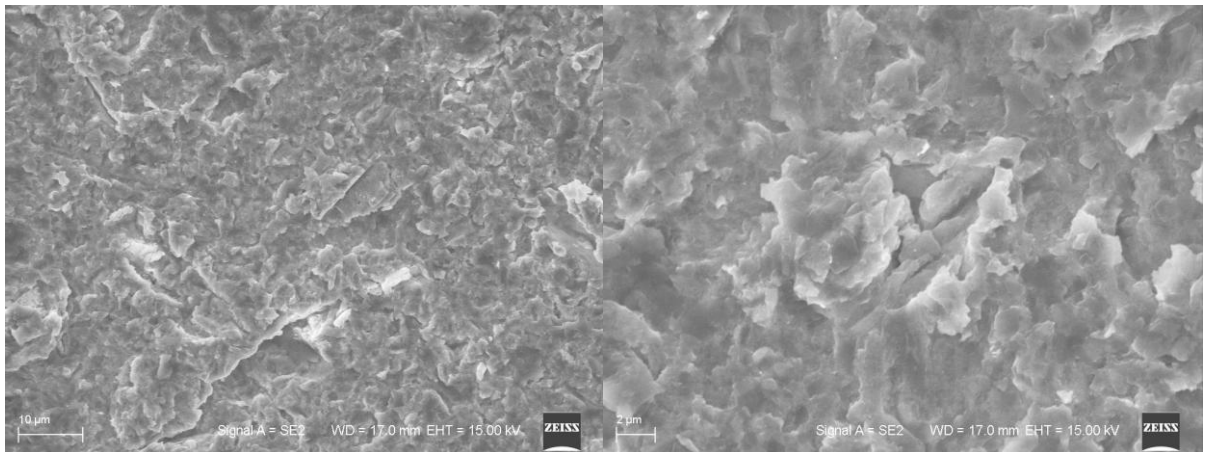
Ryc. 5.6. Obraz SEM powierzchni próbki MA. Powiększenie 3000x (po lewej) i 6000x (po prawej)



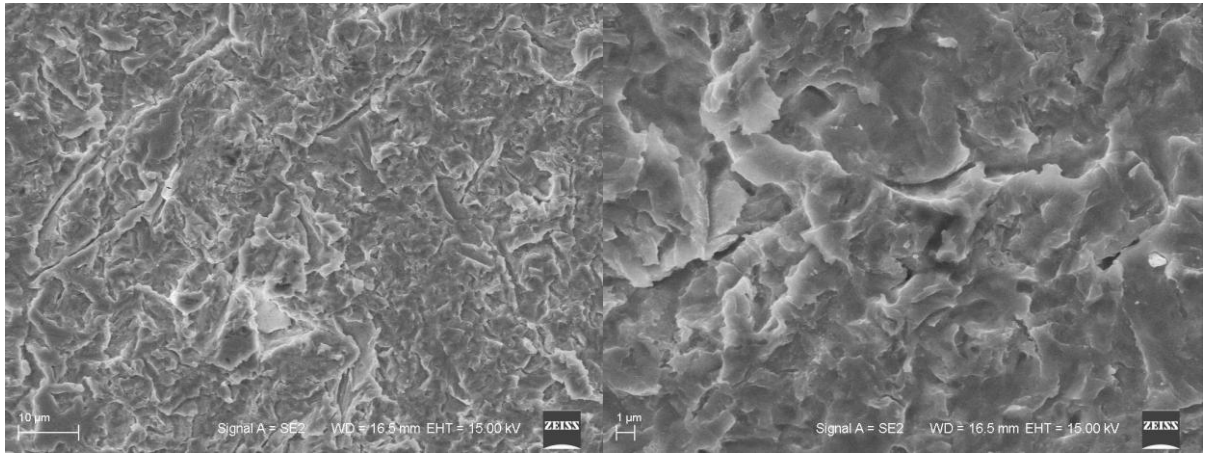
Ryc. 5.7. Obraz SEM powierzchni próbki Al₂O₃. Powiększenie 3000x (po lewej) i 6000x (po prawej)



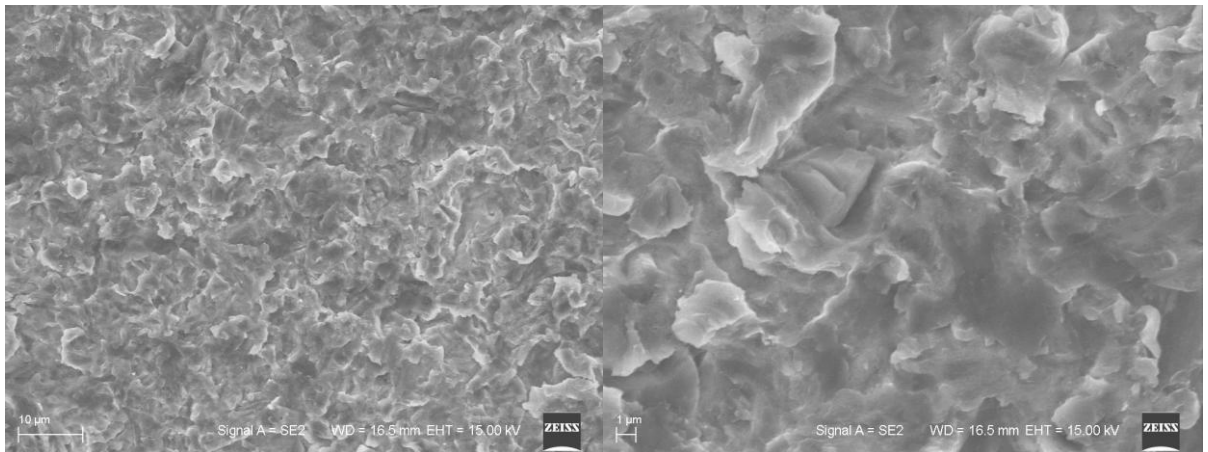
Ryc. 5.8. Obraz SEM powierzchni próbki Al₂O₃ DE. Powiększenie 3000x (po lewej) i 6000x (po prawej)



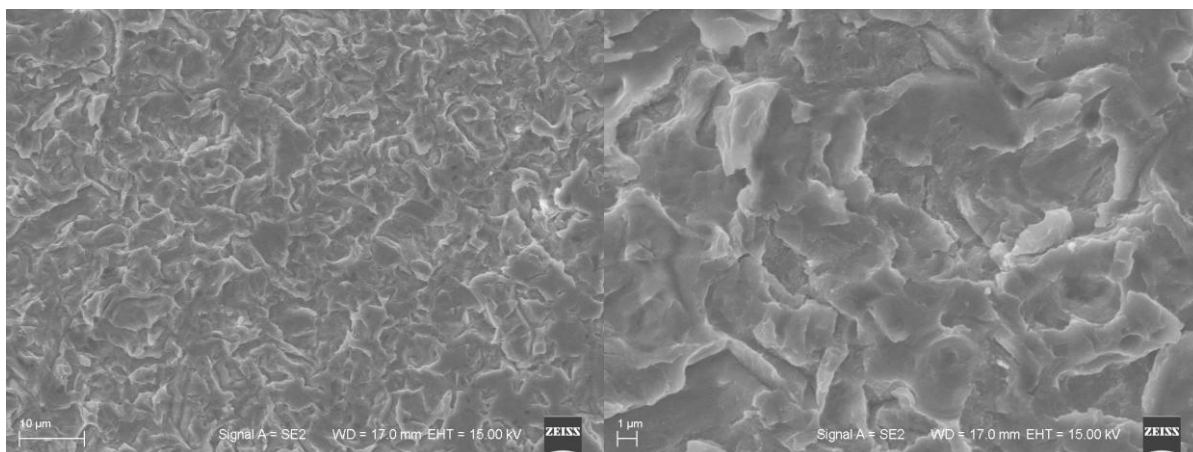
Ryc. 5.9. Obraz SEM powierzchni próbki HA. Powiększenie 3000x (po lewej) i 6000x (po prawej)



Ryc. 5.10. Obraz SEM powierzchni próbki HA DE. Powiększenie 3000x (po lewej) i 6000x (po prawej)



Ryc. 5.11. Obraz SEM powierzchni próbki HAS. Powiększenie 3000x (po lewej) i 6000x (po prawej)



Ryc. 5.12. Obraz SEM powierzchni próbki piaskowanej HAS DE. Powiększenie 3000x (po lewej) i 6000x (po prawej)

Na obrazach SEM w przypadku powierzchni maszynowej tytanu widoczne są równoległe, regularne bruzdy powstałe w wyniku frezowania. Obecne są również niewielkie nierówności wynikające z niedoskonałości procesu obróbki. Próbki piaskowane Al_2O_3 , HA/TCP oraz synteryzowanym HA/TCP posiadają powierzchnię charakterystyczną dla obróbki strumieniowo ścierniej. Jest to powierzchnia nieregularna, niejednorodna, znacznie rozwinięta, o dużym zróżnicowaniu, z wgłębieniami, karbami, wcięciami i ostrymi krawędziami. W przypadku próbek tytanu piaskowanych Al_2O_3 powierzchnia jest bardziej nieregularna niż w przypadku próbek piaskowanych materiałami ceramicznymi. W przypadku tych ostatnich nierówności są łagodniejsze, bardziej zaokrąglone. Powierzchnia próbki piaskowanej Al_2O_3 a następnie podwójnie trawionej posiada nieznacznie złagodzone nierówności w stosunku do sytuacji wyjściowej. W przypadku próbek piaskowanych materiałami ceramicznymi proces trawienia nieznacznie urozmaicił ich powierzchnie. Wydają się być one nieznacznie bardziej nieregularne.

5.4. Analiza chropowości

Do numerycznego scharakteryzowania chropowości materiałów planowanych jako implanty śródkostne zalecane jest przedstawienie przynajmniej jednego parametru amplitudowego, jednego horyzontalnego i jednego hybrydowego. Preferowane parametry amplitudowe to Ra i Rq dla pomiarów 2-D natomiast dla pomiarów 3-D Sa i Sq. Preferowane parametry horyzontalne to Sm dla pomiarów 2-D a dla pomiarów 3-D Scx i Str. Natomiast preferowane parametry hybrydowe to Δq dla pomiarów 2-D oraz $S\Delta q$ i Sdr dla pomiarów 3-D. Preferowane są pomiary 3-D (51, 79). Matematyczne opisy parametrów dostępne są w publikacji autorstwa Stout'a (87).

Tabela III przedstawia wyniki analizy chropowości. Zgodnie z zaproponowanym przez Wennenberg podział na powierzchnie gładkie ($Sa < 0.5 \mu m$), minimalnie chropowate ($Sa = 0.5-1.0 \mu m$), umiarkowanie chropowate ($Sa = 1.0-2.0 \mu m$) i chropowate ($Sa > 2.0 \mu m$) do grupy gładkich możemy zaliczyć powierzchnię maszynową (18). Pozostałe powierzchnie można zaliczyć według proponowanego podziału do powierzchni minimalnie chropowatych. Powierzchnią o największej chropowości jest powierzchnia piaskowana Al_2O_3 a następnie trawiona, nieznacznie mniejszą chropowością charakteryzuje się powierzchnia piaskowana Al_2O_3 . W przypadku piaskowania Al_2O_3 proces trawienia zwiększa chropowość. Natomiast w przypadku powierzchni piaskowanych materiałami ceramicznymi chropowość po procesie trawienia nieznacznie się zmniejsza.

Tabela III Parametry amplitudowe, horyzontalne i hybrydowe chropowatości badanych próbek na podstawie profilometrii bezstykowej przy użyciu mikroskopu interferencyjnego NT1100

	Amplitudowe				Horyzontalne		Hybrydowe	
	2-D		3-D		3-D		3-D	
	Ra (nm)	SD	Sa (nm)	SD	Str (none)	SD	Sdr (%)	SD
MA	181,94	55,86	181,91	55,77	0,12	0,09	7,13	4,16
Al2O3	713,02	35,94	712,79	35,87	0,82	0,01	144,28	6,13
Al2O3 DE	748,86	129,28	748,45	128,32	0,68	0,27	96,32	4,38
HA	664,15	77,26	663,86	76,98	0,84	0,05	115,76	4,86
HA DE	507,45	65,40	507,48	65,37	0,79	0,11	77,13	9,31
HAS	621,00	12,95	621,00	12,88	0,84	0,01	117,02	3,29
HAS DE	614,26	57,08	614,26	57,14	0,79	0,04	79,06	6,38

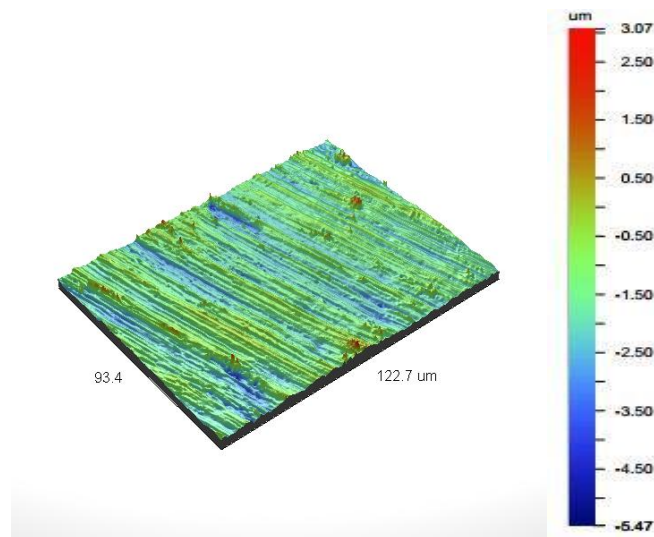
Współczynnik Str jest współczynnikiem wyrażającym stopień kierunkowości powierzchni. Parametr ten przyjmuje wartości od 0 do 1. Powierzchnie anizotropowe czyli powierzchnie o dużym ukierunkowaniu charakteryzują się wartościami poniżej 0,5 natomiast powierzchnie izotropowe czyli powierzchnie o małym ukierunkowaniu wartościami w granicach 0.5-1. Zgodnie z powyższym schematem powierzchnie maszynowa można zaliczyć do powierzchni o dużym ukierunkowaniu natomiast pozostałe powierzchnie charakteryzują się minimalnym ukierunkowaniem. Próbka Al₂O₃ DE charakteryzuje się największym uporządkowaniem spośród powierzchni izotropowych.

Wskaźnik względnego rozwinięcia powierzchni Sdr wskazuje na prawie 150% rozwinięcie powierzchni próbki piaskowanej Al₂O₃, o około 30% mniejszym rozwinięciem charakteryzują się pozostałe próbki piaskowane. Próbki piaskowane a następnie trawione charakteryzują się mniejszym od powyższych rozwinięciem z czego próbka piaskowana korundem o około 20%

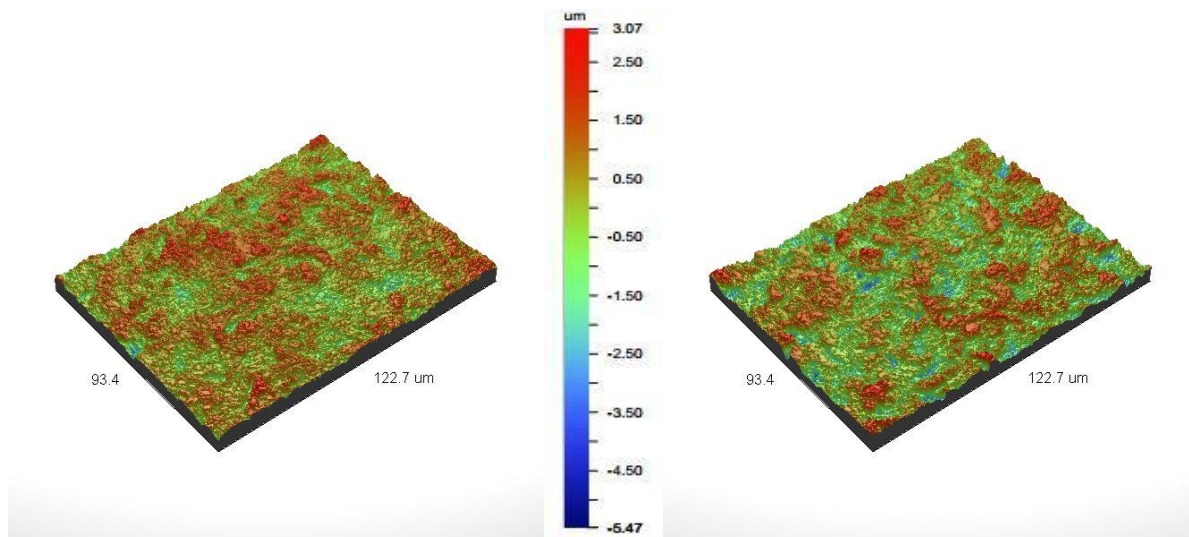
przewyższa stopień rozwinięcia próbek piaskowanych materiałami ceramicznymi. Powierzchnia maszynowa znacznie odbiega stopniem rozwinięcia od pozostałych.

Co istotne, nie ma bezpośredniego przełożenia pomiędzy wielkością parametrów amplitudowych R_a i S_a a stopniem rozwinięcia powierzchni wyrażonym w wartości parametru S_{dr} co może sugerować większy wpływ na parametry hybrydowe parametrów horyzontalnych a nie jedynie amplitudowych.

Ryciny 5.13 do 5.19 przedstawiają obrazy izometryczne powierzchni wszystkich badanych próbek stanowiące graficzną wizualizację parametrów chropowatości.

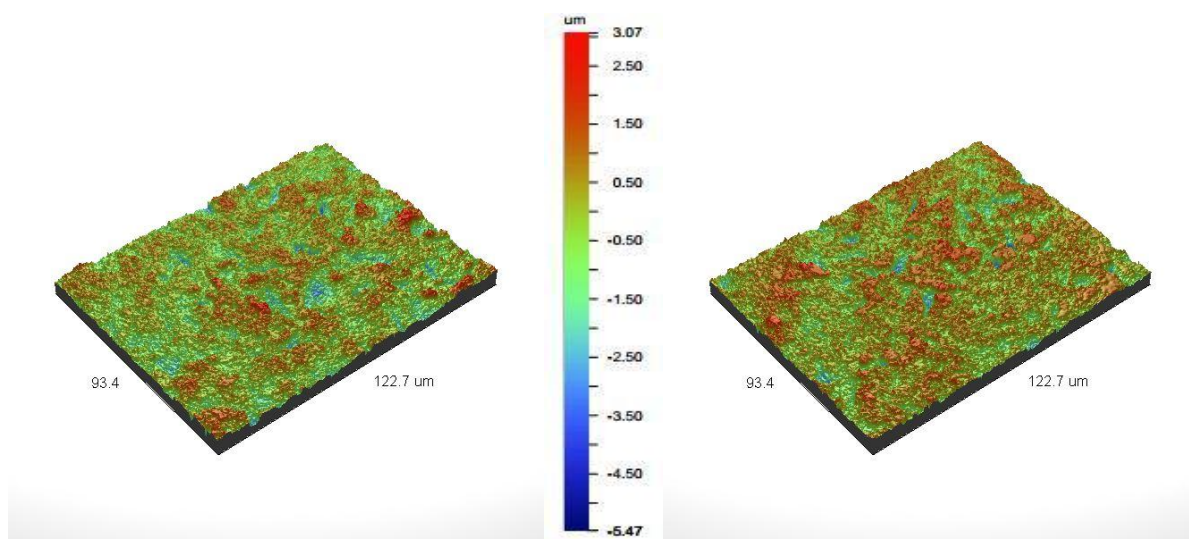


Ryc. 5.13. Obraz izometryczny powierzchni próbki MA



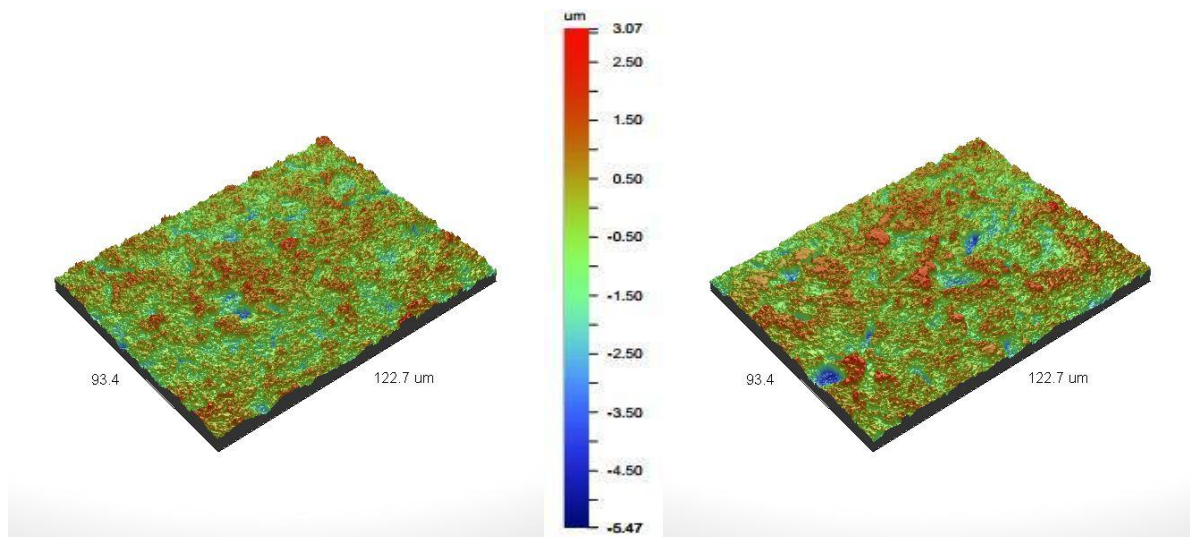
Ryc. 5.14. Obraz izometryczny powierzchni próbki Al₂O₃

Ryc. 5.15. Obraz izometryczny powierzchni próbki Al₂O₃ DE



Ryc. 5.16. Obraz izometryczny powierzchni próbki HA

Ryc. 5.17. Obraz izometryczny powierzchni próbki HA DE



Ryc. 5.18. Obraz izometryczny powierzchni próbki HAS

Ryc. 5.19. Obraz izometryczny powierzchni próbki HAS DE

5.5. Analiza składu chemicznego

Tabela IV przedstawia skład pierwiastkowy powierzchni badanych próbek uzyskany na podstawie analizy EDS. Wartości podane są w procentach wagi.

Tabela IV Skład chemiczny badanych próbek na podstawie analizy EDS podany w procentach wagi

	Tytan [wt.%]	Tlen [wt.%]	Węgiel [wt.%]	Glin [wt.%]	Wapń [wt.%]	Fosfor [wt.%]	Sód [wt.%]
MA	97,37	0	2,63	0	0	0	0
Al ₂ O ₃	38,16	40,79	3,36	17,34	0	0	0,35
Al ₂ O ₃ DE	47,47	36,50	3,11	12,65	0	0	0,27
HA	64,43	25,76	2,60	0,56	4,52	2,12	0
HA DE	96,43	0	3,59	0,26	0	0	0
HAS	70,71	20,85	2,22	0,25	4,08	1,89	0
HAS DE	93,97	1,25	4,78	0	0	0	0

Wszystkie badane próbki składają się w przeważającej części z tytanu. Stosunkowo dużo jest również tlenu w postaci warstwy tlenków powstałych spontanicznie na powierzchni tytanu w wyniku kontaktu z powietrzem atmosferycznym. Natomiast pozostałe składniki zostały wprowadzone w powierzchnie próbek w wyniku obróbki chemomechanicznej. Próbki piaskowane tlenkiem glinu zostały wzbogacone o glin który stanowi główny składnik zastosowanego ścierniwa. W niewielkiej ilości jest również obecny sód. Próbki piaskowane Al₂O₃ a następnie trawione charakteryzują się mniejszą procentowo zawartością wszystkich poza tytanem składników, głównie glinu. Proces trawienia spowodował również wzbogacenie powierzchni o niewielką ilość fluoru. Próbki piaskowane hydroksyapatytem zarówno

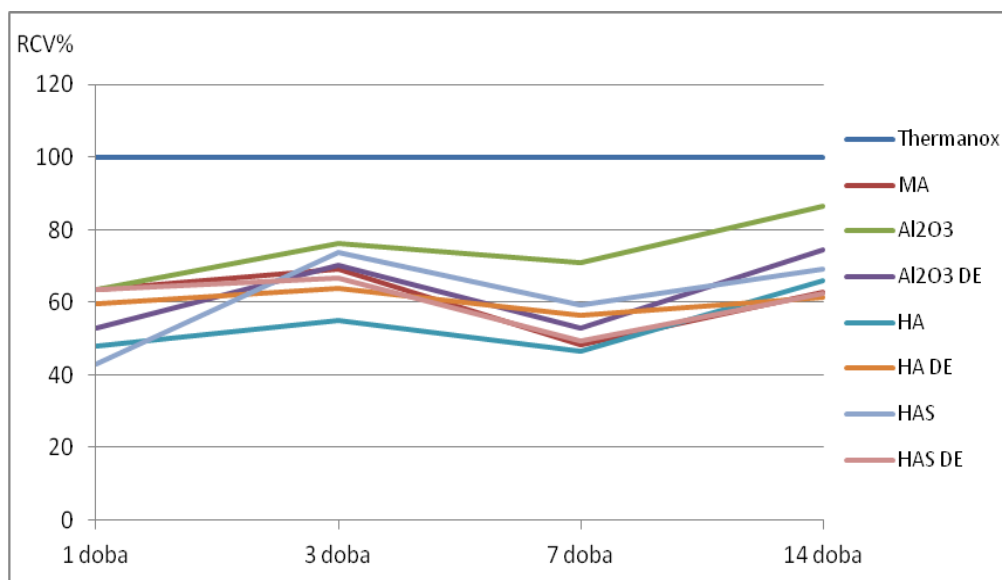
syntetyzowanym jak i nie syntetyzowanym mają skład chemiczny wzbogacony o wapń i fosfor oraz śladowe ilości glinu. Składniki te również zostały wprowadzone w powierzchnie tytanu w wyniku piaskowania próbek mieszaniną hydroksyapatytu i trójfosforanu wapnia. Niewielka obecność glinu może być związana z zanieczyszczeniem dyszy piaskarki używanym wcześniej Al_2O_3 . Proces trawienia obu rodzajów powierzchni usuwa z ich składu wapń i fosfor znacznie lub całkowicie redukując zawartość glinu. Skład chemiczny badanych próbek jest więc wynikiem składu chemicznego materiału z którego przygotowano próbkę jak i zastosowanej metody obróbki jej powierzchni. Wpływ na skład chemiczny badanych próbek ma również ich interakcja z powietrzem atmosferycznym. Komercyjnie czysty tytan klasy 4 powinien zawierać około 0,1% węgla (88). W przypadku próbek o powierzchniach maszynowych obecność węgla kształtująca się na poziomie 2,5 – 3% wagowych świadczyć może o obecności zanieczyszczeń powierzchni w postaci węglanów, które powstają na powierzchni tytanu w wyniku interakcji z powietrzem atmosferycznym (74, 89, 90). Obróbka strumieniowo-ścierna przy użyciu Al_2O_3 zwiększa zawartość węgla w powierzchni próbek natomiast proces wytrawiania ponownie zmniejsza jego zawartość. Z kolei piaskowanie materiałami ceramicznymi znacząco nie zmienia zawartości węgla w próbkach natomiast proces wytrawiania zwiększa jego ilość (88).

5.6. Analiza właściwości biologicznych modyfikowanych powierzchni tytanu.

5.6.1. Ocena żywotności komórek

Rycina 5.20. przedstawia wykres względnej żywotności komórek (RCV%) w czterech punktach czasowych na materiałach badanych w stosunku do materiału kontrolnego Thermanox - materiału o powierzchni kondycjonowanej celem osiągnięcia optymalnej adhezji

i wzrostu komórek. Wartości względnej żywotności na próbach tytanowych wzrastają wraz z czasem trwania hodowli. W 7 dniu hodowli następuje zmniejszenie względnej żywotności osteoblastów na wszystkich badanych próbkach tytanu. Najwyższe wartości względnej żywotności wykazują osteoblasty hodowane na próbkach tytanu piaskowanego Al_2O_3 natomiast najniższe dla próbki HA.



Ryc. 5.20. Wykres zmian względnej żywotności komórek (RCV%) na badanych materiałach w czasie, w odniesieniu do materiału kontrolnego Thermanox

Porównując wartości parametru RCV% osiągnięte dla różnych podłoży w tych samych okresach czasu stwierdzono brak istotnych statystycznie różnic pomiędzy podłożami w pierwszej dobie hodowli. Po trzech dobach hodowli stwierdzono istnienie dwóch jednorodnych grup wyników różniących się od siebie. Do pierwszej z nich zaliczono niższe wartości parametru RCV% osiągnięte dla podłoży HA i HA DE do drugiej natomiast wyższe wartości parametru RCV% dla podłoży MA, Al₂O₃, Al₂O₃ DE, HAS i HAS DE. Po siódmej dobie hodowli stwierdzono istnienie dwóch jednorodnych grup. Do pierwszej z nich zaliczono wartości parametru RCV% osiągnięte dla próbek Al₂O₃ i HAS do drugiej natomiast wartości parametru RCV% osiągnięte dla próbek MA, HA, HA DE, HAS, HAS DE

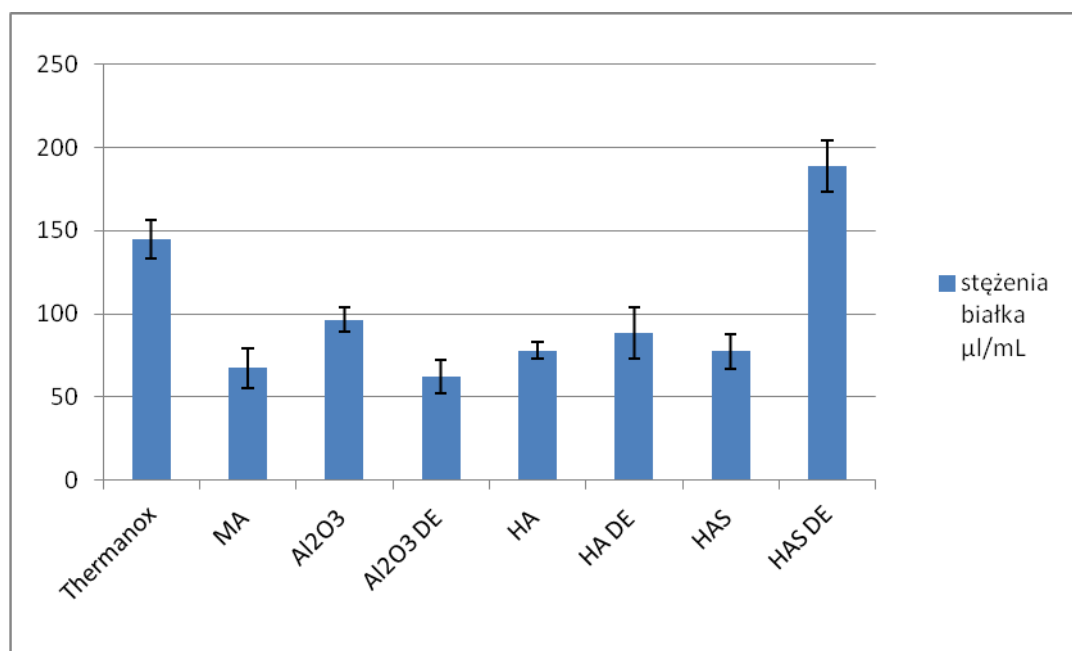
i Al₂O₃ DE. Po czternastu dobach hodowli stwierdzono istnienie również dwóch jednorodnych grup. Do pierwszej z nich zaliczono wartości parametru RCV% osiągnięte dla próbek Al₂O₃, Al₂O₃ DE, HA i HAS do drugiej natomiast wartości parametru RCV% osiągnięte dla próbek MA, HA, HA DE, HAS, HAS DE i Al₂O₃ DE.

Analiza statystyczna otrzymanych wyników wykazała istnienie statystycznie istotnych różnic pomiędzy wskaźnikiem RCV% otrzymanymi w pierwszej i czternastej dobie dla podłoża HAS a także pomiędzy trzecia a czternasta dobą dla podłoża HA. Dla pozostałych podłoży nie odnotowano występowania istotnych statystycznie różnic pomiędzy parametrem RCV% pomiędzy poszczególnymi okresami badania

Porównując wartości parametru RCV% osiągnięte dla różnych podłoży, w różnych okresach czasu w stosunku do wyników osiągniętych dla materiału kontrolnego stwierdzono brak istotnych statystycznie różnic pomiędzy parametrem RCV% osiągniętym dla podłoża Al₂O₃ po czternastu dobach. Pozostałe wartości parametru RCV% były istotnie niższe od wartości osiągniętych dla podłoża kontrolnego.

5.6.2. Ocena stężenie białka

Wyniki oceny stężenia białka w badanym materiale przedstawia rycina 5.21. Zwraca uwagę znacznie większe stężenia białka w materiale otrzymanym z próbek piaskowanych syntetyzowanym hydroksyapatytem a następnie piaskowanych. Otrzymane dla tych próbek wyniki są wyższe również od wyników otrzymanych z materiału kontrolnego o powierzchni kondycjonowanej celem stymulacji adhezji i wzrostu hodowanych na nim komórek. Wyniki dla materiałów otrzymanych z pozostałych próbek nie wykazują tak dużego zróżnicowania.

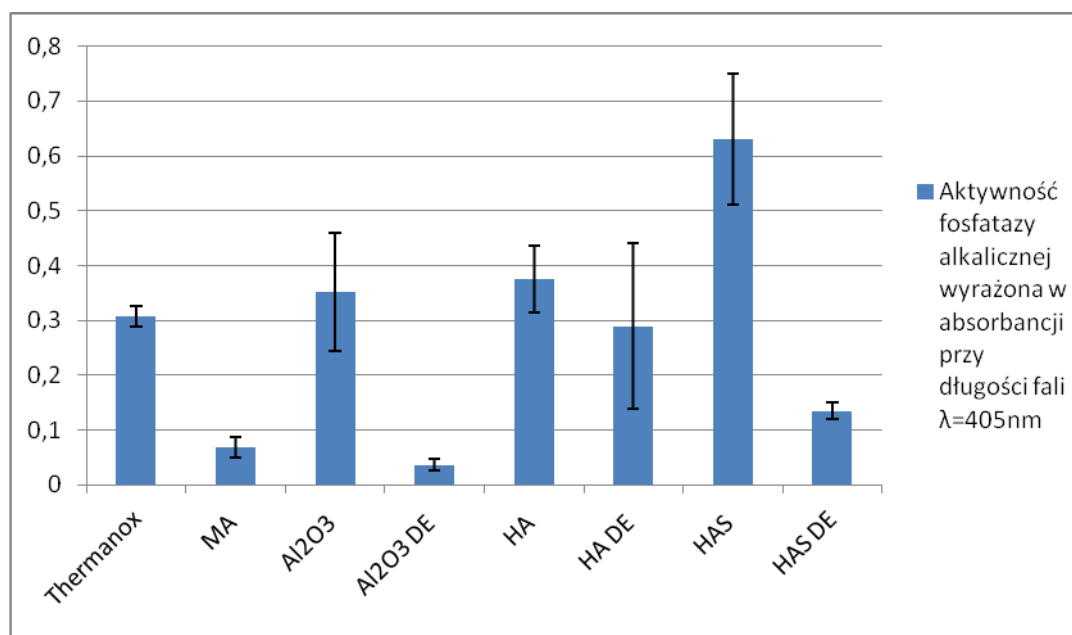


Ryc. 5.21. Stężenie białka wyrażone w µg/ml w 14 dniu hodowli

Analiza statystyczna otrzymanych wyników wykazała istnienie statystycznie istotnych różnic pomiędzy nimi. Stwierdzono obecność dwóch grup jednorodnych. Pierwszą z nich stanowiły wyniki osiągnięte dla podłoży: MA, Al₂O₃ DE, HA i HAS. Drugą z kolei dla podłoży: Al₂O₃, HA, HA DE i HAS. Wyniki osiągnięte dla podłoży HAS DE oraz dla materiału kontrolnego istotnie statystycznie różniły się od pozostałych.

5.6.3. Ocena aktywności fosfatazy alkalicznej

Rycina 5.22. ilustruje aktywność fosfatazy alkalicznej dla materiału uzyskanego z badanych próbek wyrażoną w proporcji do ilości białka. Wyniki osiągnięte dla próbek HAS, HA i Al₂O₃ przekraczają te osiągnięte przez materiał kontrolny. Natomiast wyniki dla materiału uzyskanego z próbek MA, Al₂O₃ DE oraz HAS DE są niskie i znacznie odbiegają od pozostałych.

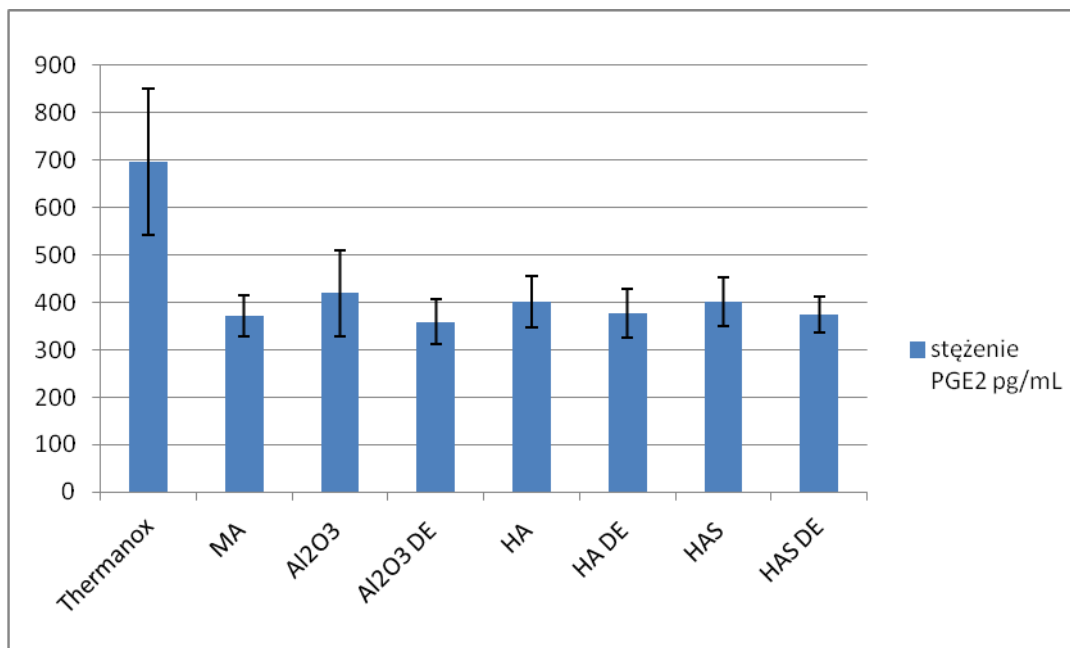


Ryc. 5.22. Wartość aktywności fosfatazy alkalicznej wyrażona jako absorbancja przy długości fali $\lambda=405\text{nm}$ w 14 dniu hodowli

Analiza statystyczna otrzymanych wyników wykazała istnienie statystycznie istotnych różnic pomiędzy nimi. Stwierdzono obecność dwóch grup jednorodnych. Pierwszą z nich stanowiły wyniki osiągnięte dla podłoży: Al₂O₃, HA i HA DE oraz dla materiału kontrolnego. Drugą z kolei dla podłoży: MA, Al₂O₃ DE i HAS DE. Natomiast wyniki uzyskane dla podłoża HAS różniły się statystycznie od pozostałych.

5.6.4. Ocena stężenia prostaglandyny E2

Wartości stężenia prostaglandyny E2 otrzymane z medium zebranego z badanych próbek wyrażone w pg/ml przedstawia rycina 5.23. Stężenie prostaglandyny w medium zebranym z materiału kontrolnego przekracza wartości otrzymane z badanych materiałów które między sobą nie różnią się znacznie.

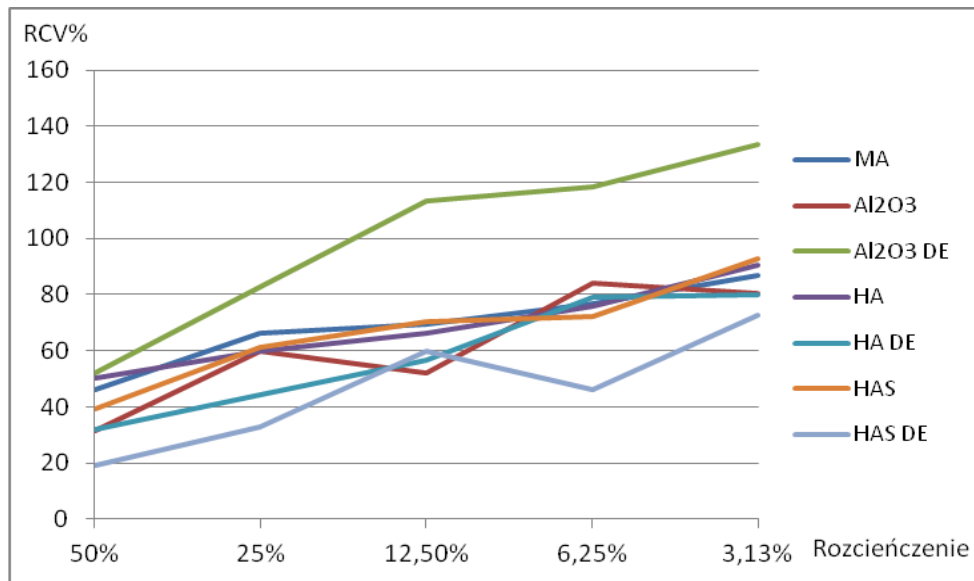


Ryc. 5.23. Stężenie PGE2 wyrażone w pg/mL w 14 dniu hodowli

Analiza statystyczna otrzymanych wyników wykazała istnienie statystycznie istotnych różnic pomiędzy nimi. Stwierdzono obecność grupy jednorodnej którą stanowiły wyniki uzyskane dla wszystkich podłoży badanych. Wyniki uzyskane dla materiału kontrolnego istotnie statystycznie odbiegały od tych osiągniętych dla próbek tytanu.

5.6.5. Ocena wzrostu komórek w długo kondycjonowanym medium

Rycina 5.24 przedstawia zmiany względnego wskaźnika żywotności komórek w zależności od rozcieńczenia kondycjonowanego medium. Dla wszystkich rodzajów kondycjonowanego medium wraz ze wzrostem rozcieńczenia kondycjonowanego medium wzrasta względny wskaźnik żywotności komórek. Wskaźnik ten jest zdecydowanie wyższy dla większych rozcieńczeń w przypadku medium kondycjonowanego insertem tytanowym o powierzchni piaskowanej Al₂O₃ i podwójnie trawionej.



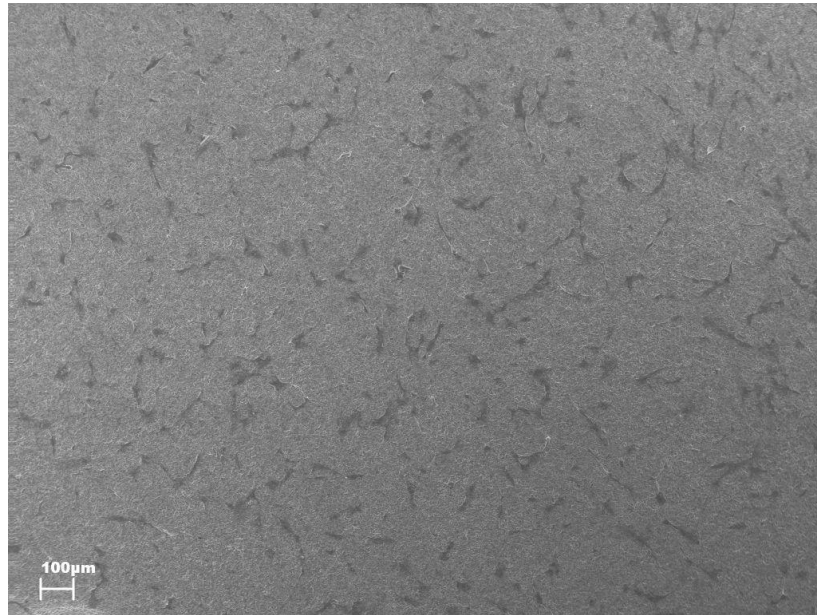
Ryc. 5.24. Wartości względnego wskaźnika żywotności komórek (RCV%) dla pięciu rozcieńczeń kondycjonowanego medium, dla każdego rodzaju insertu

Analiza statystyczna otrzymanych wyników wykazała istnienie statystycznie istotnych różnic zarówno pomiędzy różnymi rozcieńczeniami jak i pomiędzy rodzajami podłoży z których uzyskano kondycjonowane medium. Dla każdego rodzaju kondycjonowanego medium odnotowano istotne statystycznie zwiększenie wartości względnej żywotności komórek wraz ze zmniejszeniem stężenia medium. Względna żywotność komórek hodowanych w medium uzyskanym z próbki Al₂O₃ DE dla każdego rozcieńczenia medium za wyjątkiem 50% była statystycznie wyższa od pozostałych. Natomiast najniższe wartości względnej żywotności komórek uzyskano dla wszystkich rozcieńczeń za wyjątkiem 12,5% dla kondycjonowanego medium uzyskanego z próbki HAS DE. Dla rozcieńczenia 50% grupy jednorodne stanowiły wyniki osiągnięte z medium kondycjonowanego uzyskanego z próbek Al₂O₃ i HA DE a także Al₂O₃ DE i HA. Dla rozcieńczenia 25% grupę jednorodną stanowiły wyniki osiągnięte z medium kondycjonowanego uzyskanego z próbek Al₂O₃, HA i HAS. Dla rozcieńczenia 12,5% grupy jednorodne stanowiły wyniki osiągnięte z medium kondycjonowanego uzyskanego z próbek Al₂O₃ i HA DE a także MA, HA i HAS oraz MA, HAS i HAS DE. Dla rozcieńczenia 6,25% grupy jednorodne stanowiły wyniki osiągnięte z medium

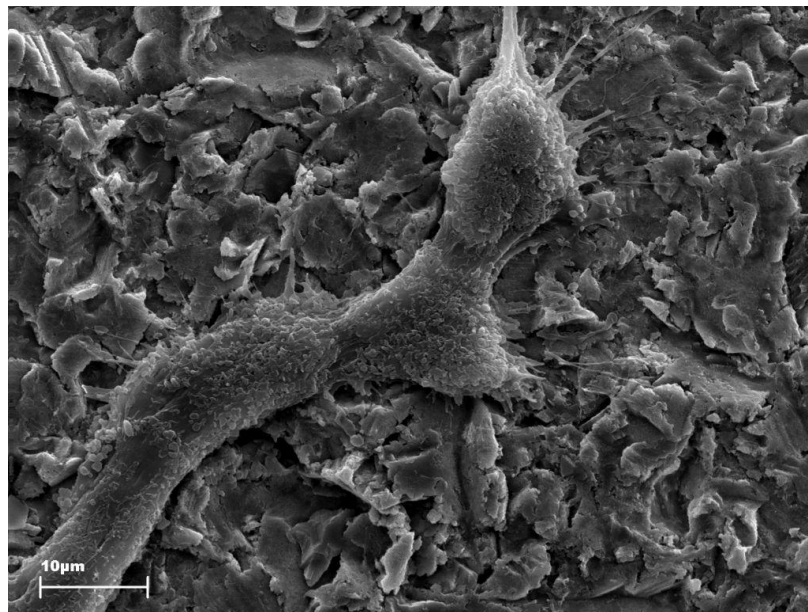
kondycjonowanego uzyskanego z próbek MA, HA, HAS a także MA, HA, HA DE. Dla rozcieńczenia 3,13% grupy jednorodnej stanowiły wyniki osiągnięte z medium kondycjonowanego uzyskanego z próbek Al₂O₃ i HA DE a także MA i HA oraz HA i HAS.

5.6.6. Obrazy SEM osteoblastów hodowanych na badanych powierzchniach

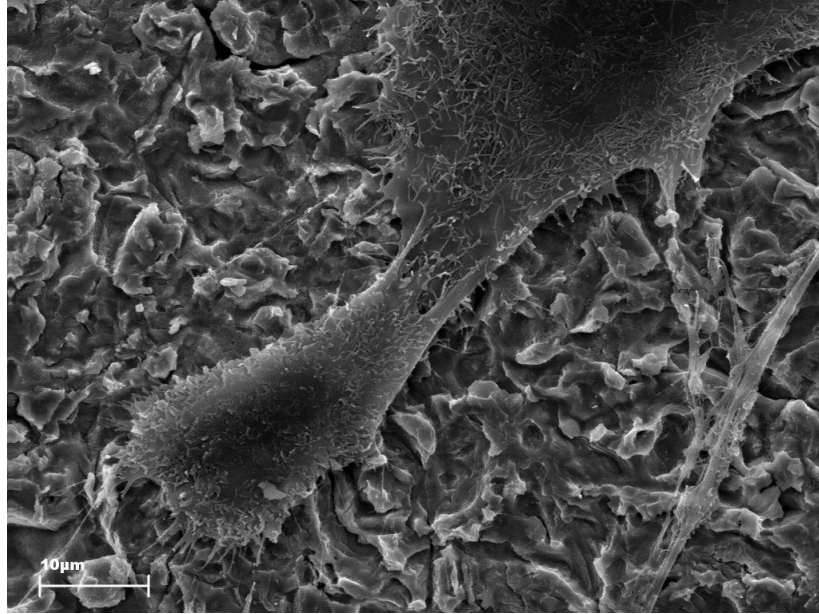
Na badanych materiałach nie stwierdzono obecności martwych komórek co wskazuje na biogodność badanych próbek. Zauważalne były różnice pomiędzy podłożami maszynowymi a chropowatymi bez zauważalnej różnicy między poszczególnymi podłożami chropowatymi. Po jednej dobie hodowli na powierzchni tytanu widoczne są stosunkowo regularnie rozmieszczone komórki rozproszone po całej powierzchni próbki Ryc 5.25. W przypadku powierzchni chropowatych osteoblasty charakteryzują się większą grubością są wydłużone, poligonalne, z lamellopodiami. Na ich powierzchni obecnych jest wiele małych kulistych uwypukleń. Kontakt komórek z podłożem wydaje się nie być tak bliski jak w przypadku komórek hodowanych na podłożach gładkich. Natomiast zdolność komórek do adhezji do podłoża wyraża się obecnością lamellopodii rozchodzących się promieniście na biegunach komórek, zakotwiczonych w nierównościach podłoża Ryc 5.26. Można również obserwować podziały komórek Ryc 5.27.



Ryc. 5.25. Osteoblasty na powierzchni próbki HAS po jednej dobie hodowli. Powiększenie 150x

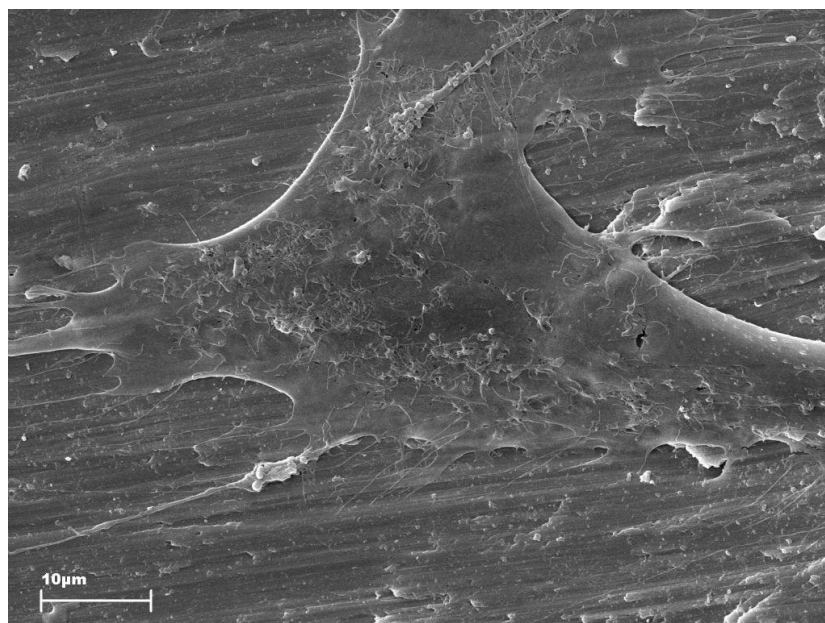


Ryc. 5.26. Osteoblast na powierzchni próbki Al_2O_3 i trawionej po jednej dobie hodowli. Powiększenie 5000x

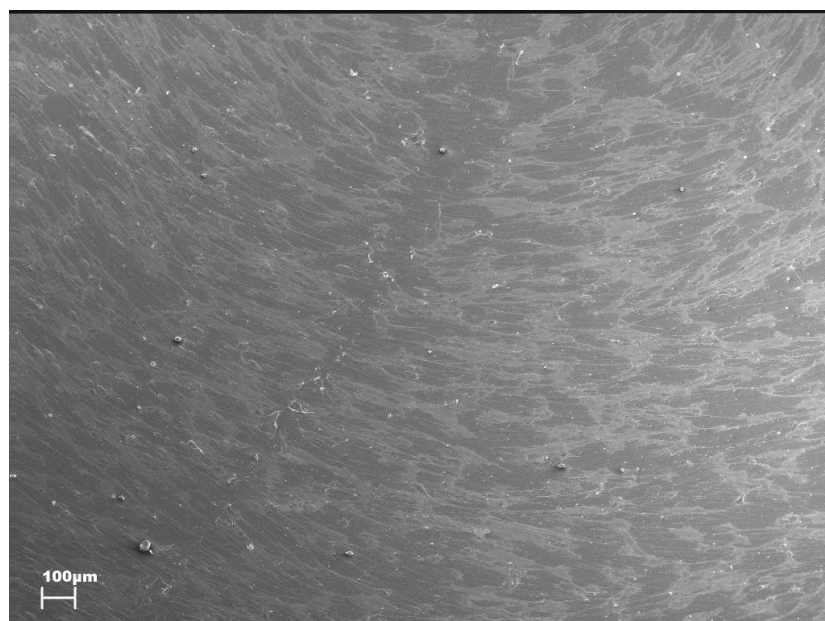


Ryc. 5.27. Osteoblast na powierzchni próbki HAS DE po jednej dobie hodowli. Powiększenie 5000x

Na powierzchni maszynowej osteoblasty są bardziej płaskie i znacznie bardziej rozciągnięte zajmując większą powierzchnię podłoża. Obecne są duże uwypuklenia cytoplazmy sugerujące aktywną migrację komórek a także liczne drobne wypustki na ich powierzchniach sugerujące dużą aktywność komórkową. Kontakt z komórek z podłożem wydaje się bardzo bliski Ryc 5.28. Zwraca uwagę również zorientowanie komórek względem bruzd powstałych w wyniku frezowania powierzchni próbki Ryc 5.29.



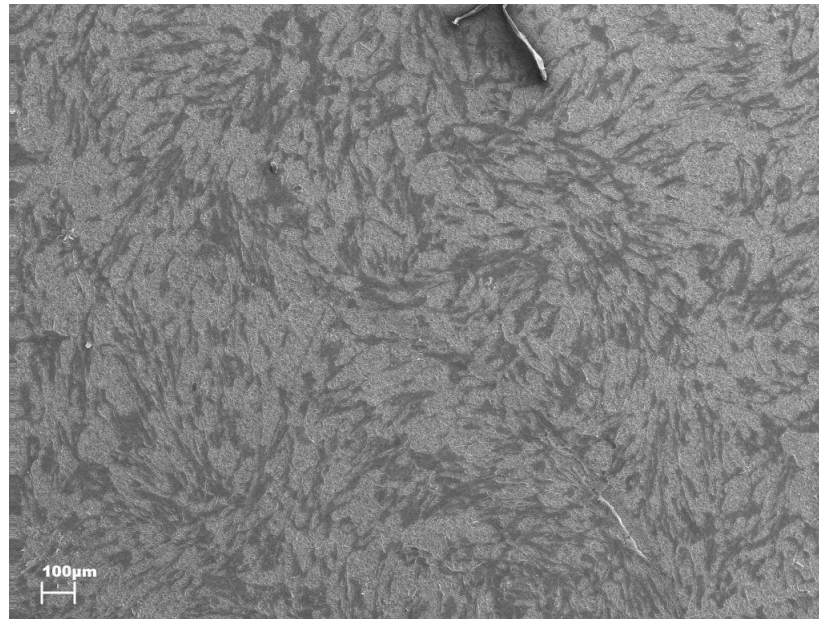
Ryc. 5.28 Powierzchnia próbki MA po jednej dobie hodowli. Powiększenie 5000x



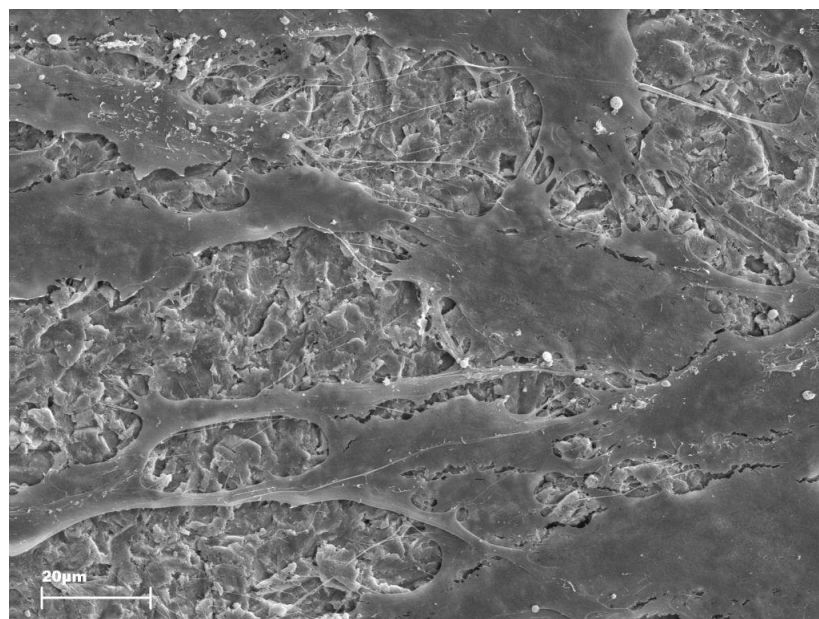
Ryc. 5.29. Powierzchnia próbki MA po jednej dobie hodowli. Powiększenie 150x

Po trzech dobach hodowli na powierzchniach chropowatych próbek widoczne jest na wszystkich ich rodzajach rozprzestrzenianie się osteoblastów i kolonizowanie coraz większej powierzchni próbek. Komórki są regularnie rozmieszczone po całej powierzchni próbek i nie są zorientowane według żadnego schematu Ryc. 5.30. Powierzchnia komórek ulega zwiększeniu. Stają się one bardziej płaskie i wydłużone. Komórki zachowują ze sobą fizyczny

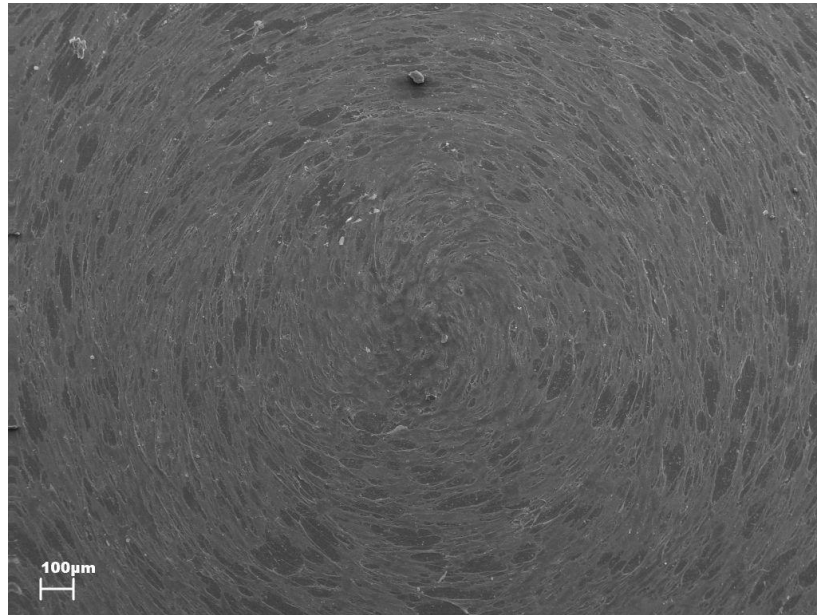
kontakt poprzez lamellopodia Ryc 5.31. Podobne zmiany mają miejsce na powierzchni maszynowej. Tu nadal widoczne jest zorientowanie komórek względem bruzd na powierzchni próbek. Osteoblasty hodowane na powierzchniach gładkich są bardziej płaskie niż te hodowane na powierzchniach chropowatych i pokrywają większą powierzchnię próbek Ryc 5.32.



Ryc. 5.30. Powierzchnia próbki HAS DE po trzech dobach hodowli. Powiększenie 150x

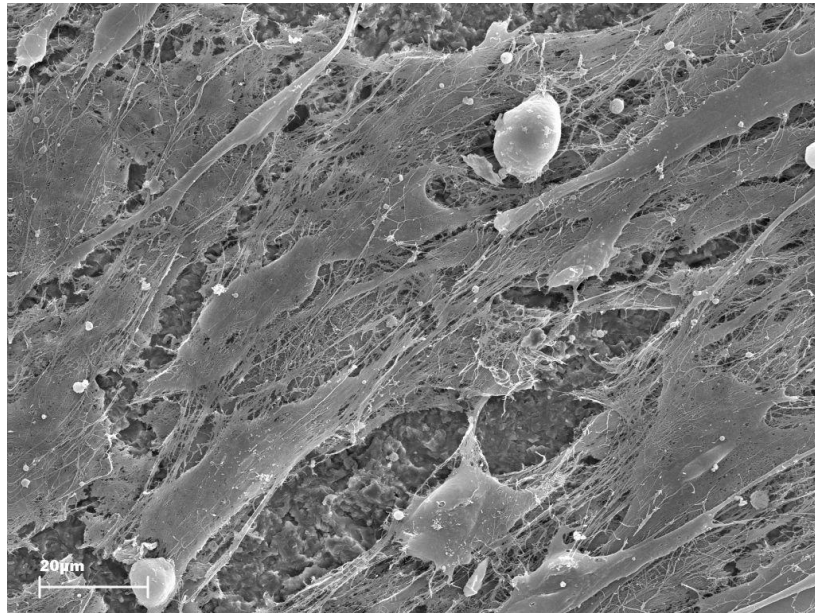


Ryc. 5.31. Powierzchnia próbki Al₂O₃ DE po trzech dobach hodowli. Powiększenie 2500x

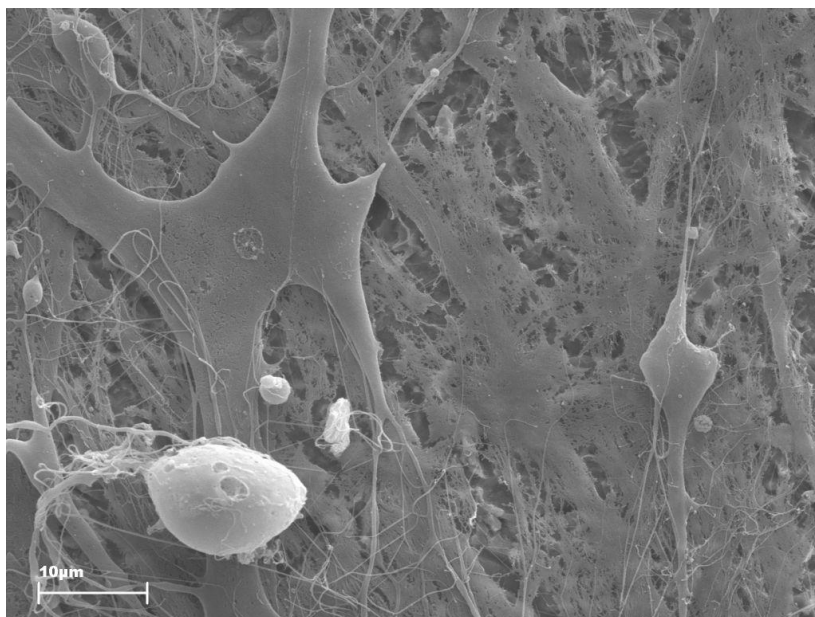


Ryc. 5.32. Powierzchnia próbki MA po trzech dobach hodowli. Powiększenie 150x

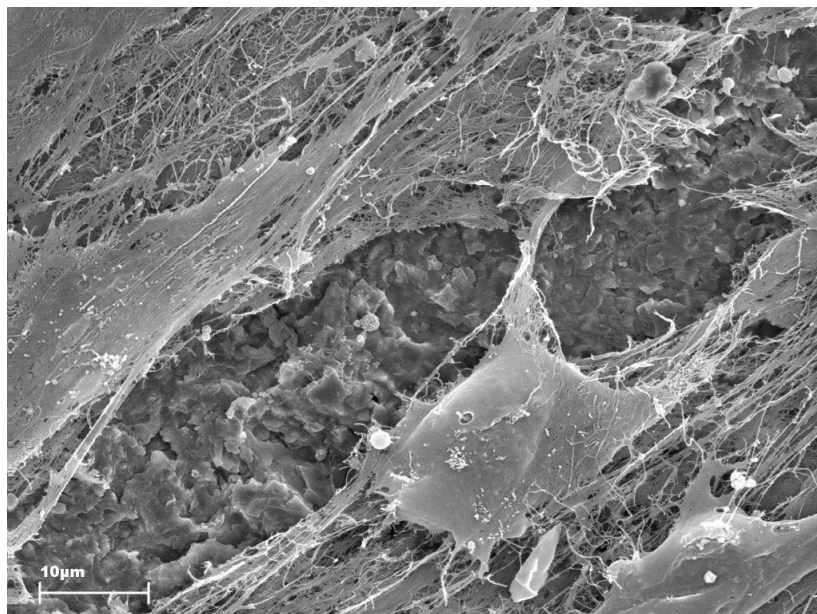
Po siedmiu dobach zarówno na powierzchniach chropowatych jak i na gładkich widoczne jest pokrycie prawie całej powierzchni próbek. Wzrost komórek jest coraz bardziej zlewny Ryc. 5.33. Miejscami osteoblasty wydają się rosnać warstwowo Ryc 5.34. Widoczne jest wydłużenie komórek oraz znaczne zwiększenie ilości włókien Ryc. 5.35. Na powierzchniach chropowatych komórki nie orientują się według podłoża a względem siebie nawzajem układając się równolegle jedne do drugich Ryc. 5.36. Na powierzchniach maszynowych zorientowanie komórek nadal związane jest obecnością bruzd na powierzchni próbek Ryc. 5.37. Zarówno w przypadku powierzchni gładkich jak i chropowatych na warstwie płaskich wydłużonych komórek obecne są formy kuliste. Ich obecność może być związane z brakiem kontaktu komórek z podłożem Ryc. 5.38.



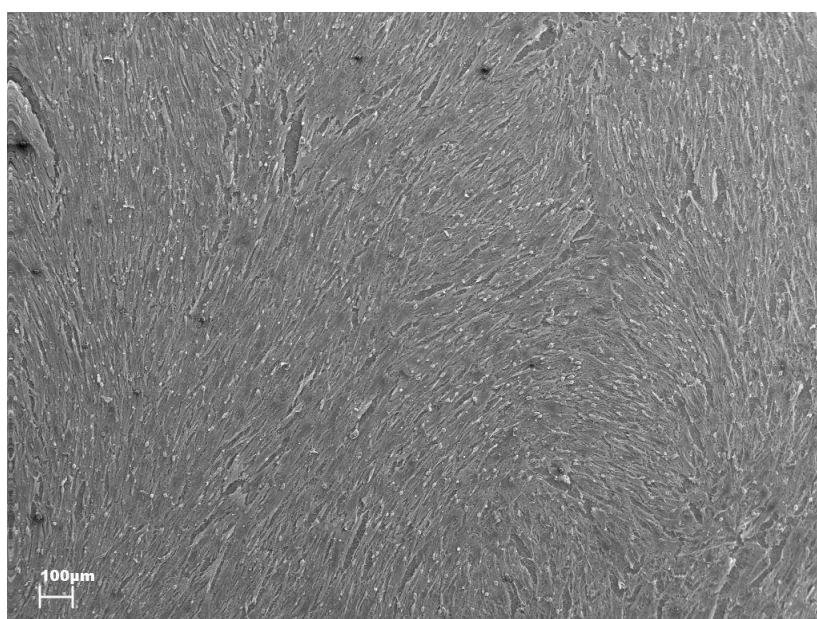
Ryc. 5.33. Powierzchnia próbki HAS po siedmiu dniach hodowli. Powiększenie 2500x



Ryc. 5.34. Powierzchnia próbki HA po siedmiu dniach hodowli. Powiększenie 5000x



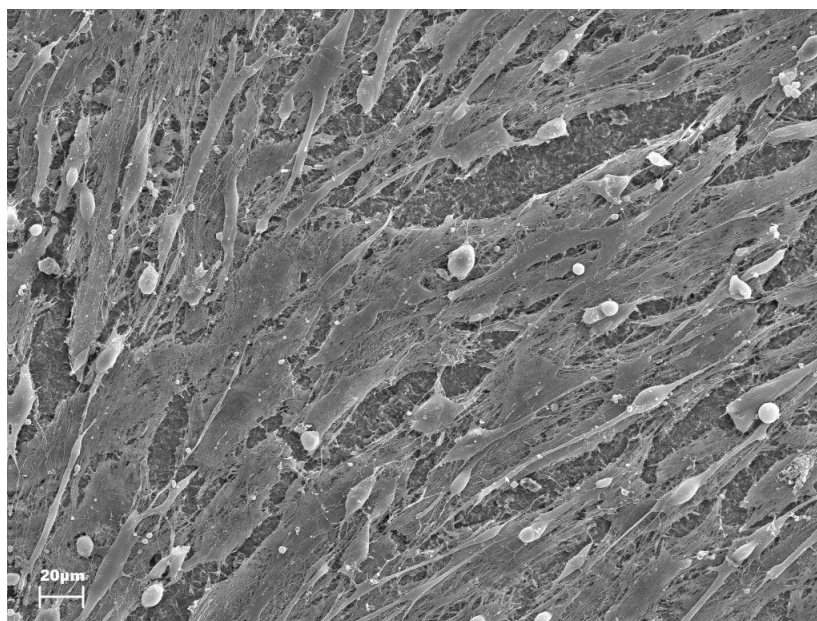
Ryc. 5.35. Powierzchnia próbki HAS po siedmiu dniach hodowli. Powiększenie 5000x



Ryc. 5.36. Powierzchnia próbki HAS po siedmiu dniach hodowli. Powiększenie 150x



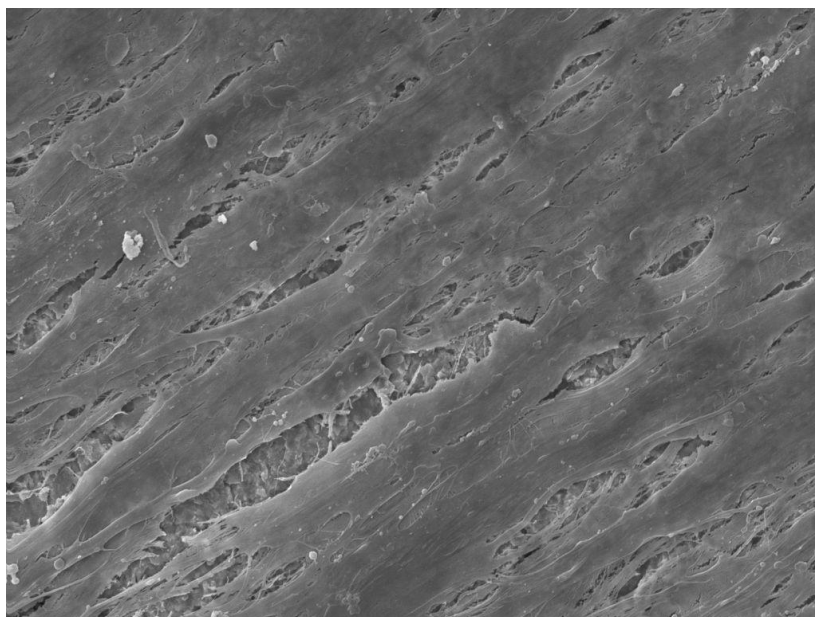
Ryc. 5.37. Powierzchnia próbki MA po siedmiu dobach hodowli. Powiększenie 150x



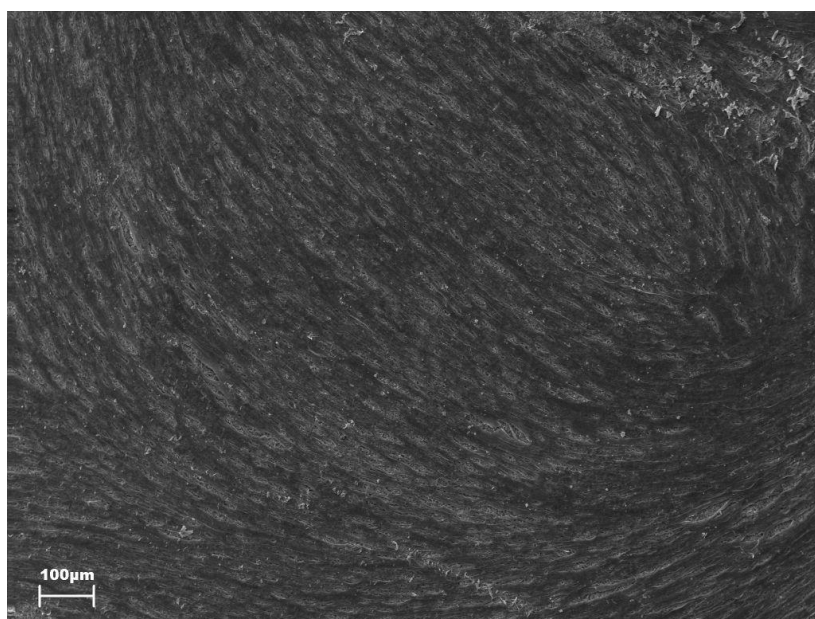
Ryc. 5.38. Powierzchnia próbki HAS po siedmiu dobach hodowli. Powiększenie 1000x

Po czternastu dobach hodowli na próbkach chropowatych osteoblasty pokrywają prawie całą powierzchnię próbek intensywnie tworząc macierz zewnątrzkomórkową. Kształt komórek pozostaje podłużny Ryc. 5.39. Długie osie osteoblastów pozostają nadal zorientowane względem siebie nawzajem a nie względem topografii powierzchni Ryc 5.40.

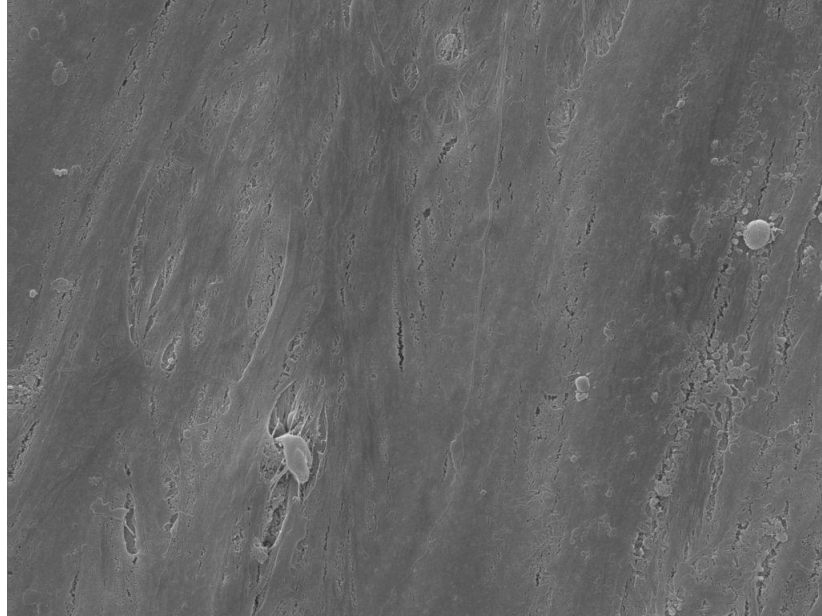
W przypadku hodowli na powierzchniach gładkich osteoblasty ścielnie pokrywajc caa powierzchnie pr6bek. Kom6rki s srsze ni w przypadku hodowli na powierzchniach chropowatych, o trudno rozr6znicznych obrysach tworzc zlewajc si kultur 5.41. Rozmieszczenie kom6rek nadal pozostaje w zwi zku z topografi powierzchni pr6bki Ryc. 5.42.



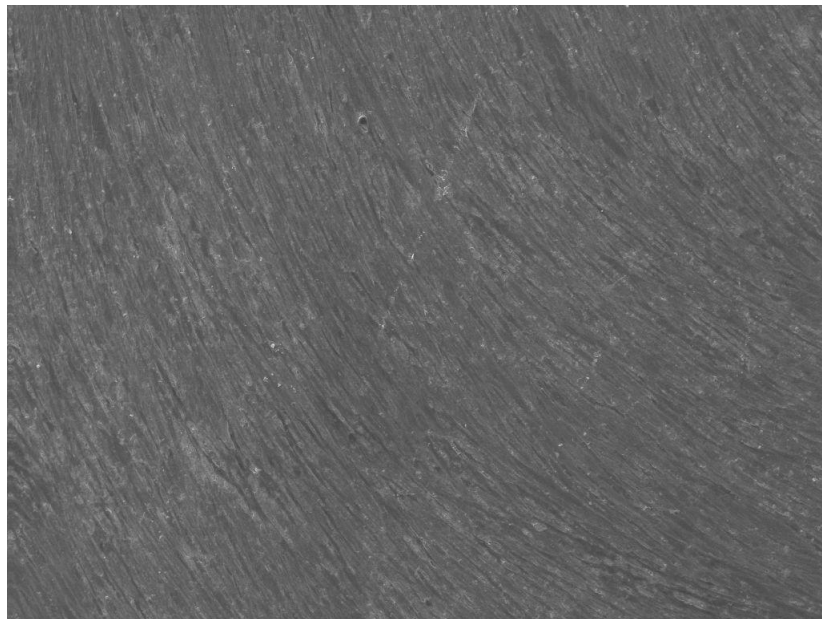
Ryc. 5.39. Powierzchnia pr6bki HA po czternastu dniach hodowli. Powi kszenie 2500x



Ryc. 5.40. Powierzchnia pr6bki Al₂O₃ po czternastu dniach hodowli. Powi kszenie 150x



Ryc. 5.41. Powierzchnia próbki MA po czternastu dniach hodowli. Powiększenie 2500x



Ryc. 5.42. Powierzchnia próbki MA po czternastu dniach hodowli. Powiększenie 150x

6. Dyskusja

6.1. Badania wstępne

W pracy zaprezentowano procedurę przygotowania preparatów histologicznych nieodwapnionej kości i implantu tytanowego. Technika przygotowywania tego typu preparatów została zaprezentowana już w latach osiemdziesiątych XX wieku jednakże prezentowana w pracy procedura opracowana w Katedrze i Zakładzie Histologii i Embriologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu powstała specjalnie na potrzeby badań na bazie rutynowej techniki zatapiania materiału w żywicach stosowanej w preparatyce do badań przy użyciu mikroskopii elektronowej (91). Preparaty histologiczne zawierające przekrój połączenia kości z implantem są aktualnie szeroko stosowane w badaniach naukowych dotyczących oceny interakcji wszczepu z tkanką (92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103).

Tkanka kostna rutynowo przygotowywana do analizy histologicznej zazwyczaj jest odwapniana (104). Procedura ta nie może jednak zostać przeprowadzona w przypadku gdy w preparacie obecny jest metal pod postacią tytanowego implantu (91). Kolejnym argumentem świadczącym za pominięciem procesu odwapniania kości jest fakt, że preparaty histologiczne zawierające przekrój poprzeczny połączenia implant-kość są najbardziej wartościowe wówczas gdy tkanka kostna nie jest odwapniona (35). Proces odwapniania może zaburzyć morfologię komórkową. Odwapnianie przy użyciu kwasów powoduje również różnego typu zaburzenia i zniekształcenia tkanek miękkich oraz denaturację i pogrubienie włókien kolagenu budujących tkankę kostną, szczegóły komórkowe są mniej wyraźne (105). W prezentowanych badaniach została użyta tkanka kostna nie poddana odwapnieniu co

spowodowało skomplikowanie i utrudnienie i wydłużenie poszczególnych etapów procedury laboratoryjnej, jednakże dzięki temu uzyskano lepszy jakościowo preparat.

Preparaty histologiczne najczęściej wykonuje się z tkanek miękkich. Ilość badanego materiału jest z reguły niewielka. Najkorzystniejsza wielkość bloczka tkanki przygotowywanej do badania przy użyciu mikroskopu elektronowego to 0,5 mm w każdym wymiarze (106). Zazwyczaj po odwodnieniu zatapiany jest on w parafinie bądź w żywicy a następnie przy użyciu mikrotomu cięty na małej grubości skrawki. Preparaty analizowane przy użyciu mikroskopu elektronowego mają grubość 100nm do 100 μ m (106, 107). W przypadku preparatów implant-kość już sama ilość materiału jest duża – badany implant o średnicy kilku milimetrów należy celem przeprowadzenia badań wyciąć wraz z otaczającą tkanką kostną. Uzyskany w ten sposób bloczek implant-kość ma zazwyczaj średnicę około 10mm a długość, w zależności od implantu, może sięgać a nawet przekraczać 10mm. Kolejną trudnością jest rodzaj badanej tkanki. Duża jej gęstość oraz obecność substancji mineralnych utrudnia przenikanie stosowanych środków chemicznych. W połączeniu z dużą grubością tkanki kostnej dochodzi do utrudnienia wnikania utrwalcza, opóźnienia procesu odwadniania oraz infiltracji żywicy. W związku powyższym konieczne jest wydłużenie poszczególnych etapów utrwalania, odwadniania oraz zatapiania w żywicy.

W prezentowanych badaniach preparat został natychmiast po pobraniu utrwalony w 2,5% roztworze glutaraldehydu w 0.1M buforze fosforanowym, pH 7.4 Utrwalacz ten jest szeroko stosowany w procedurach stosowanych do mikroskopii elektronowej (106). Wskazane jest stosowanie go w stężeniu między 1,0 a 3,5%, pH powinno być niższe niż 7,5 aby powstrzymać polimeryzację i utratę reaktywnych grup glutaraldehydu, a najbardziej wskazanym jest bufor fosforanowy (106). Ten sam utrwalacz proponują również w publikacjach dotyczących preparatów implant-kość Mohammadi i Keller (95, 108). Stosują

oni różne stężenia- Mohamaddi 2,5% i Keller 3% glutaraldehyd, jednakże stosowanie glutaraldehydu o stężeniach między 1,0 a 3,5% przynosi porównywalne efekty (95, 106, 108). Część autorów stosuje do utrwalania również 0,1% glutaraldehyd z dodatkiem 4% paraformaldehydu(92, 93, 94). Najczęściej stosowanym utrwalaczem jest natomiast buforowany roztwór formaliny w różnych stężeniach (96, 97, 98, 99). Glauert podaje, że właśnie dwa ostatnie utrwalacze dają najlepsze efekty w przypadku bardzo dużych preparatów (106). Park natomiast proponuje utrwalenie materiału w 70% alkoholu etylowym co, jak podaje, minimalizuje deformację tkanek (100). Standardowa procedura utrwalania niewielkich preparatów do obserwacji przy użyciu mikroskopii elektronowej trwa zazwyczaj kilka godzin. W publikacjach dotyczących przygotowywania preparatów implant-kość długość okresu utrwalania waha się od 24-48h do 1–2 tygodni (35, 95, 100). W prezentowanych badaniach został on ze względu na rodzaj oraz ilość badanej tkanki a także na rodzaj utrwalacza wydłużony do 3 miesięcy i przeprowadzony w temperaturze 4°C. Przeprowadzenie procesu utrwalania w temperaturze 4°C proponują również Cordioli i Piatelli (92, 94).

Standardowo proces odwadniania w przypadku preparatyki do mikroskopu elektronowego przeprowadza się w szeregu alkoholi lub acetonu. Stosuje się jednokrotnie 70 i 95% roztwory wodne oraz 2 krotne 100% alkohol etylowy lub aceton. Poszczególne etapy trwają maksymalnie do 15 minut. Jest to jednak procedura stosowana przy bloczkach tkanki wielkości do 0,5mm w każdym wymiarze (106). W publikacjach dotyczących przygotowywania preparatów implant-kość proces odwadniania najczęściej jest przeprowadzany w szeregu alkoholi 70, 90, 95, i 100% czyli tak, jak w prezentowanych badaniach (93, 94, 95, 96, 99, 100, 101, 102, 108). Czas trwania poszczególnych etapów odwadniania w cytowanych publikacjach jest jednak dłuższy niż w schematach podawanych przez Glauerta. Park podaje na przykład 12 h czas inkubacji (jednokrotnie w każdym ze

stężeń (70, 90, 95%) i czterokrotną inkubację w 100% alkoholu (100). Schroeder natomiast 24 godzinny czas inkubacji (jednorazowo w stężeniach 60%, 80%, 90% i 100% etanolu) (113). W prezentowanych badaniach czas trwania poszczególnych etapów jest dłuższy zarówno w porównaniu ze schematami podawanymi przez Glauerta, ze względu na wielkość preparatu, jak również w porównaniu z cytowanymi publikacjami ze względu na użycie w nich odmiennych, bardziej hydrofilnych żywic do zatapiania. Kompletnie odwodnienie jest niezwykle istotne, aby dużej wielkości preparat został całkowicie infiltrowany żywicą, jest to tym bardziej ważne w przypadku zastosowania żywicy hydrofobowej (106).

W prezentowanych badaniach do infiltracji preparatu została zastosowana żywica epoksydowa Epon. Materiał ten charakteryzuje się jednorodną polimeryzacją oraz niewielką zmianą wymiaru podczas polimeryzacji wynoszącą 2% (106). Charakteryzuje się on również stosunkowo dużą lepkością co wymaga wydłużenia czasu trwania procedury infiltracji (106). Prawdopodobnie z tego powodu w podobnych badaniach zastosowane były inne, mniej lepkie żywice. Najczęściej materiał inkludowany był w żywicach metylmetakrylanowych Technovid 9100 (96, 100, 103), a także w żywicach glikolmetakrylanowych (światłoutwardzalny Technovid 7200) (92, 93, 94, 97, 101, 102). Inkludowanie prowadzono również w żywicy LR White, a także w Spurr Plastic Mixture – materiale o najmniejszej gęstości co ułatwia infiltrację (95, 108).

Standardowa procedura zatapiania w żywicach epoksydowych w przypadku preparatyki stosowanej do mikroskopii elektronowej trwa do 24 godzin i przeprowadzana jest w temperaturze pokojowej (106). W prezentowanych badaniach czas ten został wydłużony do 8 dni, aby umożliwić penetrację tkanki na całej jej grubości co proponuje Glauert (106). Również obniżona została temperatura, miało to na celu zahamowanie przedwczesnej polimeryzacji co pozwoliło na penetrację całej grubości tkanki przez żywicę. Standardowy w preparatyce do mikroskopii elektronowej etap polimeryzacji żywicy trwa około 12 h i jest

przeprowadzany w temperaturze 60°C (106). Również ten etap został w prezentowanych badaniach znacznie wydłużony. Modyfikacji uległa również temperatura w której proces był przeprowadzany. Z tych samych przyczyn jak w przypadku etapu penetracji została ona obniżona.

Barwienie podobnie jak w badaniach Ellingsena, Mohammadiego, Parka i Schwarza przeprowadzone było przy użyciu błękitu toluidyny (95, 98, 101, 102, 103). W publikacjach spotyka się też barwienie błękitem metylenowym (96), kwaśną i zasadową fuksyną połączoną z błękitem toluidyny (92, 93, 94), lub też tzw. Villanuva bone stain zastosowanym podczas utrwalania (99, 100).

Cięcie tytanu połączonego z inkludowaną w żywicy tkanką kostną również stanowi trudność. Problem stanowi różnica twardości dwóch materiałów, tytanu i kości, składających się na preparat, otrzymanie preparatu grubości rzędu kilkudziesięciu mikrometrów oraz zachowanie połączenia między tkanką kostną a powierzchnią implantu. Początkowo celem ominięcia części trudności z inkludowanych w żywicy preparatów implant-kość usuwano implant i dopiero wówczas bloczki były cięte na skrawki (109, 110, 111). Dopiero w roku 1982 została przez K. Donatha i G. Breunera opracowana metoda przygotowywania cienkich preparatów implant-kość polegająca na cięciu a następnie zeszlifowywaniu preparatów do żądanej grubości. Jest to tzw. Säge-Schliff Technique (91). Dzięki tej metodzie udało się wyeliminować problemy związane ze zbyt dużą grubością preparatów, niejednorodną ich grubością, obecnością rys. Później szukano uproszczenia opracowanej procedury proponując np. pominięcie procesu szlifowania (105). Proponowano również jej modyfikacje takie jak przeprowadzenie procesu cięcia i szlifowaniu po uprzednim naklejeniu preparatu na szkiełko podstawowe (112, 113).

Proces przygotowywania cienkich preparatów z bloczków zawierających implant i kość zazwyczaj rozpoczyna się od cięcia bloczków na cienkie plastry z użyciem piły (91, 105, 112,

114, 115). Tarcza najczęściej pokryta jest ziarnami diamentu (91, 112, 114, 115) i taka właśnie zastosowana została w prezentowanych badaniach. Można również zastosować tarcze pokryte karborundem (115). W prezentowanych badaniach została użyta tarcza grubości 100 μ m, taką grubość proponuje Rohrer (115). Cięcie może być prowadzone w chłodzeniu roztworem gliceryny (113) bądź innymi specjalnymi płynami chłodzącymi np.: OPTA He 500 (91), można również do chłodzenia podczas cięcia użyć wody (112) tak jak ma to miejsce w prezentowanych badaniach. Polecaną grubością otrzymanych preparatów jest grubość 100 μ m do 200 μ m (91, 115).

W celu uzyskania żądanej grubości preparatów umożliwiającej ich ocenę przy użyciu mikroskopu świetlnego należy je następnie zeszlifować i wypolerować. Część autorów proponuje szlifowanie mechaniczne z chłodzeniem wodą która również oczyszcza preparat(91, 113, 114). Stosowane są papiery ściernie o wielkości ziaren 500, 800 i 1200. Przy użyciu papieru o grubości ziaren 1200 nie jest konieczne polerowanie. Proces mechanicznego szlifowania trwa nie więcej niż 5 minut co znacznie skraca proces przygotowywania preparatów (91). Ten sposób również umożliwia uzyskanie preparatów o powierzchni równoległej do powierzchni szkiełka podstawowego na którym są one umieszczone oraz jednolitej grubości preparatu (114). W prezentowanych badaniach zastosowane zostało szlifowanie i polerowanie ręczne podobnie jak w badaniach Hippra i współpracowników oraz Kellera, przy użyciu papierów drobnoziarnistych (108, 112). Stosując tą metodę należy często kontrolować grubość preparatu, ponieważ niejednolity nacisk na preparat może powodować nierównomierne jego wycienienie (112). Kłopot można stanowić również nierównomierne zeszlifowywanie twardego tytanu, mniej twardej kości oraz tkanek miękkich (114). Ta metoda jest ponadto bardzo czasochłonna (112).

Istnieją również publikacje w których proces szlifowania i polerowania został pominięty. Bloczek zawierający implant i kość przecina się do odsłonięcia przekroju poprzecznego

wszczepu, powierzchnię tą następnie się wybarwia i pokrywa szkiełkiem nakrywkowym. Szkiełko nakrywkowe jest następnie odcinane od bloczka wraz z preparatem grubości 10 μ m. Metoda ta umożliwia pominięcie czasochłonnego procesu szlifowania i polerowania jednakże empiryczne ustawienie mikrotomu tak, by otrzymać skrawki żądanej grubości również jest czasochłonne. Eliminacja pęknięć i rys osiągnięta jest przez stabilizację preparatu szkiełkiem nakrywkowym podczas cięcia a także wykorzystaniem mieszaniny wody i gliceryny w celu chłodzenia i lubrykacji (105).

Zaprezentowana procedura przygotowania preparatów histologicznych nieodwapnionej kości i implantu tytanowego powstała na bazie rutynowej techniki zatapiania materiału w żywicach stosowanej w preparatyce do badań przy użyciu mikroskopii elektronowej. Wprowadzone do tej metody modyfikacje pozwoliły na uzyskanie optymalnego preparatu nieodwapnionej kości do oceny w mikroskopie świetlnym. Przy użyciu mikroskopu świetlnego możliwa jest obserwacja przekroju połączenia kości z implantem dzięki czemu możliwa jest ocena procesu osteointegracji. Jakość preparatów umożliwia ocenę histologiczną tkanki kostnej w sąsiedztwie gwintu. Metoda ta umożliwia też wybarwianie każdego preparatu oddzielnie, daje to możliwość zastosowania różnych rodzajów barwień. Jednakże ze względu na zaistnienie obiektywnych trudności niemożliwe było kontynuowanie badań z zastosowaniem opracowanej techniki.

6.2. Badania zasadnicze

Na przebieg interakcji pomiędzy wszczepionym implantem śródkostnym a otaczającą go tkanką kostną ma wpływ między innymi powierzchnia implantu. Istnieje szeroka gama metod obróbki powierzchni wszczepów śródkostnych prowadzących do powstania różnorodnych pod względem topografii, chropowatości i chemii powierzchni. Ponieważ obróbka tytanu

prowadząca do zmiany topografii i chropowatości prowadzi również do zmiany chemii powierzchni dlatego też właściwości powierzchni wszczepów pod względem tych trzech właściwości mogą się między sobą znacząco różnić (51). Udokumentowany jest wpływ zmian topografii, chropowatości i chemii powierzchni na odpowiedź komórkową (33, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124). Znana jest przewaga chropowatej powierzchni nad powierzchniami gładkimi w kwestii adhezji, kolonizacji i proliferacji komórek (57, 58, 118, 125, 126). Udowodniono również przewagę powierzchni umiarkowanie chropowatych nad znacznie chropowatymi, minimalnie chropowatymi i gładkimi w kwestii reakcji na nie tkanki kostnej (18). Znany jest również korzystny wpływ biokompatybilnych i osteokondykcyjnych związków fosforanu wapnia na reakcje tkanki kostnej podczas gdy wpływ tlenku glinu nadal nie został jednoznacznie zdefiniowany (20, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 127, 128).

W prezentowanych badaniach porównywane jest oddziaływanie na odpowiedź biologiczną powierzchni o regularnej i nieregularnej topografii, powierzchni gładkich i chropowatych, powierzchni złożonych z tytanu, związków fosforanu wapnia oraz zawierających w swoim składzie glin.

Ocena względnej żywotności komórek hodowanych na badanych materiałach nie wykazała istnienia znaczących różnic pomiędzy różnymi powierzchniami. Uwagę zwracają najwyższe wyniki osiągnięte dla hodowli prowadzonej na próbkach piaskowanych Al_2O_3 . Co prawda nie są one statystycznie wyższe od wartości uzyskanych dla innych podłoży jednakże jako jedyne w czternastej dobie osiągają wartości porównywalne do materiału kontrolnego. Wysokie wartości parametru RCV% osiągnięte dla komórek hodowanych na podłożu Al_2O_3 są dla każdego okresu badania porównywalne z parametrami osiągniętymi dla komórek hodowanych na podłożu HAS. Rozpatrując natomiast kwestie podłoży piaskowanych materiałami ceramicznymi tylko w przypadku hodowli na nich prowadzonych odnotowano statystycznie istotny wzrost parametru RCV% pomiędzy początkiem a końcem okresu

hodowli. Odnosząc osiągnięte wyniki do oceny potencjału osteoblastów w procesie osteointegracji można przypuszczać, że w przypadku tytanu piaskowanego Al_2O_3 można uzyskać stabilne wysokie parametry odpowiedzi biologicznej już od momentu implantacji. W przypadku tytanu piaskowanego hydroksyapatytem i trójfosforanem wapnia reakcja tkanki kostnej początkowo mniej korzystna może ulegać z czasem dynamicznej poprawie. Natomiast w przypadku tytanu piaskowanego synteryzowanym hydroksyapatytem i trójfosforanem wapnia odpowiedź osteoblastów może od samego początku być pozytywna a dodatkowo może dynamicznie wzrastać wraz z czasem interakcji tkanka - materiał.

Odnosząc odpowiedź biologiczną do organizacji podłoża Hamiltona a także Bigerellego podają, że komórki preferują powierzchnie relatywnie nieuporządkowane nad powierzchniami uporządkowanymi (56, 129). Powyższe publikacje nie mają jednakże przełożenia na wyniki prezentowanych badań. W przypadku oceny żywotności komórek hodowanych na powierzchniach o uporządkowanej topografii czyli próbek MA w porównaniu z powierzchniami nieuporządkowanymi nie są obecne istotne statystycznie różnice.

Na podstawie osiągniętych wyników testów MTS nie stwierdzono również wpływu chropowatości podłoża hodowlanego na żywotność osteoblastów. Co prawda od trzeciej do czternastej doby stwierdzono istnienie co najmniej dwóch grup jednorodnych jednakże dla każdego punktu czasowego w obrębie grupy jednorodnej w skład której wchodziły wyniki dla gładszego podłoża MA zaliczano również wyniki osiągnięte dla podłoża najbardziej chropowatych czyli Al_2O_3 DE. Możliwe, że związane jest to z faktem, że różnice chropowatości pomiędzy próbkami były małe. Wennerber za chropowatość stymulującą odpowiedź biologiczną uznaje taką o parametrze $Sa > 1 \mu m$ natomiast wszystkie badane próbki cechowały się wartościami tego parametru poniżej $1 \mu m$ (18). Żywotność komórek może również być związana z parametrami nie badanymi w prezentowanych badaniach takimi jak hydrofilność czy energia powierzchniowa (47, 130, 131).

Podobne, do uzyskanych w pracy, wyniki osiągnął również La Guehenec. Odnotował on brak różnic między żywotnością komórek hodowanych na powierzchniach o różnych chropowatościach chociaż różnice chropowatości podłoży w prezentowanych przez niego badaniach są większe (Ra 160nm – 2500nm) (20). Również Citeau nie odnotował różnic żywotności pomiędzy hodowlami prowadzonymi na podłożach o różnej chropowatości przy czym wartości parametrów chropowatości były zbliżone do wartości uzyskanych w prezentowanych badaniach (127). Natomiast wzrost żywotności osteoblastów wraz ze zwiększeniem chropowatości podłoża odnotował Zereidost i Canabarro (66, 132).

Żywotność osteoblastów hodowanych na próbkach tytanowych oceniana na podstawie testu MTS wskazuje na nieznacznie gorsze wyniki w porównaniu z żywotnością komórek hodowanych na materiale kontrolnym. Może być to związane z różnicami w składzie chemicznym obu materiałów: dwutlenku tytanu i modyfikowanym celem poprawy adhezji komórek polistyrenem. Wpływ na ten fakt mogą mieć również zanieczyszczenia powierzchni tytanu związkami węgla, uwalnianie jonów czy też inna energia powierzchniowa (84). Porównując natomiast różnice żywotności pomiędzy próbkami tytanowymi nie odnotowano wpływu składu chemicznego podłoża na żywotność hodowanych na nich osteoblastów. Nie odnotowano znaczących różnic między materiałami złożonymi głównie z tytanu (MA), materiałami wzbogaconymi o glin (Al_2O_3 , Al_2O_3 DE) a materiałami wzbogaconymi o związki wapnia i fosforu (HA, HAS). Nie odnotowano również negatywnego wpływu procesu syntezy materiału ceramicznego który może prowadzić do powstania alfa lub beta trójfosforanu wapnia bądź tlenku wapnia czyli potencjalnie szkodliwych *in vivo* faz które mogą powstać podczas procesu syntezy hydroksyapatytu (133, 134). Co ciekawe najwyższe parametry żywotności osiągnęły osteoblasty hodowane na tytanie wzbogaconym o największą procentowo zawartość glinu którego wpływ na przebieg osteointegracji nadal pozostaje kontrowersyjny. Z kolei najniższe parametry żywotności uzyskały osteoblasty

hodowane na tytanie modyfikowanym materiałami ceramicznymi, które mają udokumentowany pozytywny wpływ osteoindukcyjny (20, 53, 66, 68). Co ważne próbki piaskowane tlenkiem glinu a także te piaskowane materiałami ceramicznymi mają porównywalną chropowatość co powinno pozwolić w większym stopniu ocenić wpływ modyfikacji chemicznej powierzchni. Wyniki prezentowanych badań odpowiadają tym uzyskanym przez la Gueheneca (84). Podaje on niższe wyniki żywotności komórek hodowanych na tytanie w porównaniu z tymi hodowanymi na materiale kontrolnym a także brak różnic między wartościami żywotności komórek hodowanych na gładkim tytanie, tytanie piaskowanym Al_2O_3 a następnie wytrawianym a także piaskowanym mieszaniną HA/TCP a następnie trawionym (84). Z kolei zjawisko początkowego zmniejszenia żywotności osteoblastów w przypadku hodowli prowadzonych na materiale piaskowanym mieszanina HA/TCP która z czasem ulega znacznej poprawie odnotował w swoich badaniach również Citeau (127). Także Dos Santos odnotował negatywny wpływ TCP na odpowiedź osteoblastów w początkowych okresach trwania hodowli (128).

Tak więc próbując powiązać osiągnięte wyniki żywotności komórek z parametrami organizacji, chropowatości i chemii powierzchni nie udało się ustalić znaczących zależności.

Ilość białka uzyskana z hodowli prowadzonych na różnych podłożach może stanowić odzwierciedlenie stanu namnożenia osteoblastów a także syntezy przez nie macierzy zewnątrzkomórkowej. Większa ilość białka uzyskana z hodowli może wskazywać na istnienie korzystnych parametrów podłoża które mogą stymulować potencjał osteointegracyjny hodowanych na nim osteoblastów. W prezentowanych badaniach najwyższe stężenia białka, znacząco wyższe od innych podłoży a także od materiału kontrolnego, uzyskano dla hodowli prowadzonej na materiale piaskowany synteryzowanym hydroksyapatytem i trójfosforanem wapnia a następnie podwójnie trawionym. Niższe, porównywalne z sobą wyniki uzyskały natomiast hodowle prowadzone na podłożu Al_2O_3 , następnie na HA DE, HA i HAS.

Porównując wartości uzyskanego z poszczególnych hodowli białka do wartości względnej żywotności komórek wg testu MTS uwagę zwraca podobne zestawienie podłoży. Pomijając wyniki dla podłoża HAS DE otrzymujemy wysokie wyniki dla tytanu piaskowanego Al_2O_3 i nieznacznie niższe dla podłoży piaskowanych syntetyzowany i nie syntetyzowanym hydroksyapatytem i trójfosforanem wapnia.

W prezentowanych badaniach nie odnotowano zależności pomiędzy organizacją powierzchni a ilością uzyskanego z hodowli białka. Wartości uzyskane dla wysoce zorganizowanego podłoża maszynowego są bowiem porównywalne dla tych osiągniętych dla najwyżej niezorganizowanych podłoży HA i HAS. Bigerelle podaje, że ludzkie osteoblasty charakteryzują się najintensywniejszą proliferacją na chropowatych izotropowych powierzchniach, mniejszą na powierzchniach chropowatych anizotropowych i najmniejszą na powierzchniach gładkich izotropowych a także anizotropowych Anselme podaje natomiast niższą proliferację na mniej zorganizowanych powierzchniach (31, 32).

Anselme i współpracownicy podają słabszą proliferację osteoblastów na powierzchniach chropowatych ($Ra\ 2,19 - 3,14\mu m$) w porównaniu z gładkimi ($Ra\ 0,16 - 0,30\mu m$) (33). Podobne wyniki uzyskano w szeregu badań (31, 86, 124, 135, 136, 137, 138). Z kolei inni autorzy wskazują na zintensyfikowanie proliferacji komórek na powierzchniach chropowatych (57, 58, 118, 125, 126, 129). Odnotowano również brak zależności pomiędzy proliferacją komórek a rozwinięciem powierzchni na której prowadzono hodowlę co może oznaczać, że przyłączanie i proliferacja komórek niekoniecznie powiązane są z podłożem na którym są hodowane (31, 65, 132). W prezentowanych badaniach natomiast wartości stężenia białka które można zinterpretować jako ilość namnożonych komórek również nie wiąże się z chropowatością próbek na których prowadzona była hodowla. Co prawda największe stężenie białka uzyskano z hodowli prowadzonej na chropowatej powierzchni próbki HAS DE o wartości parametru $Sa=614nm$ to równocześnie do jednorodnej grupy wyników według

analizy statystycznej zaliczono wyniki uzyskane dla próbek o chropowatości wyrażonej parametrem Sa w granicach od 181nm do 748nm. Podobne wyniki uzyskał Lauer obserwując, że ludzkie osteoblasty przylączyły się bardzo dobrze do powierzchni tytanu zarówno gładkiego, umiarkowanie i intensywnie chropowatego a ich model wzrostu był niezależny od struktury powierzchni (54). Można więc przypuszczać, że rozpatrywanie powierzchni wyłącznie pod względem chropowatości nie pozwala na skorelowanie tego parametru z proliferacją hodowanych na niej osteoblastów lub też różnice parametrów chropowatości nie są dość duże. Proliferacja komórek może również być związana z parametrami nie badanymi w prezentowanych badaniach takimi jak hydrofilność czy energia powierzchniowa (47, 130, 131).

Wyników proliferacji osteoblastów na badanych powierzchniach nie udało się również powiązać z różnicami w składzie chemicznym powierzchni próbek. Porównując proliferację osteoblastów wyrażoną w ilości białka uzyskanego z prowadzonych hodowli uwagę zwraca znacznie wyższy wynik uzyskany z hodowli prowadzonej na próbkach HAS DE przewyższający nawet wartości dla materiału kontrolnego. Osiągnięte wyniki dla podłoża HAS DE można wiązać ze składem chemicznym próbki złożonej prawie wyłącznie z biokompatybilnego tytanu. Jednakże w przypadku próbek o zbliżonym składzie (MA, HA DE) a także bardzo podobnej chropowatości i topografii (HA DE) ilość białka uzyskanego w hodowli jest znacznie niższa. Natomiast skład obu grup jednorodnych wskazuje, że ani obecność czystego tytanu, ani inkorporowany glin czy też materiały ceramiczne nie mają statystycznie istotnego wpływu na proliferację komórek. Nie odnotowano również negatywnego wpływu procesu syntezy materiału ceramicznego który może prowadzić do powstania alfa lub beta trójfosforanu wapnia bądź tlenku wapnia czyli potencjalnie szkodliwych *in vivo* faz, które mogą powstać podczas procesu syntezy hydroksyapatytu (133, 134). Porównując natomiast ilość białka uzyskaną z hodowli prowadzonych na

próbek wzbogaconych o glin z hodowlami prowadzonymi na próbkach wzbogaconych o materiały ceramiczne różnice nie są istotne statystycznie. Wyniki dla próbek zawierających najwięcej glinu są natomiast nieznacznie wyższe niż pozostałych.

Wyniki prezentowanych badań nie zgadzają się z doniesieniami innych autorów. La Guehenec wskazuje na negatywny wpływ glinu na proliferację komórek (20). Z kolei Dos Santos wskazuje na pozytywny wpływ TCP na namnażanie osteoblastów (128). Podobnie jak Zereidoost, który odnotowuje pozytywny wpływ wzbogacenia powierzchni tytanu w wapń i fosfor skutkujący zwiększeniem żywotności i proliferacji komórek (66). Osiągnięte wyniki nie wskazują bowiem ani na pozytywny wpływ związków ceramicznych ani negatywny wpływ glinu na proliferację osteoblastów. Odpowiadają natomiast wynikom osiągniętym przez Wennenberg i Piatellego, którzy nie odnotowali negatywnego wpływu glinu na odpowiedź biologiczną (74, 75).

Tak więc podobnie jak w przypadku żywotności komórek również proliferacja osteoblastów nie jest zależna od organizacji, chropowatości a także chemii powierzchni na których prowadzono hodowle.

Aktywność fosfatazy alkalicznej jest wskaźnikiem różnicowania osteogenicznych komórek, formowania kości i mineralizacji matriksu (84). Jest wczesnym markerem różnicowania i osiąga maksymalne wartości w momencie rozpoczęcia mineralizacji (85). Jest to marker związany z dojrzałymi komórkami osteoblastycznymi. W prezentowanych badaniach najwyższe wartości aktywności fosfatazy alkalicznej uzyskano z hodowli prowadzonych na podłożu piaskowanym synteryzowanym hydroksyapatytem i trójfosforanem wapnia. Niższe, porównywalne z sobą, uzyskano dla hodowli prowadzonych na tytanie piaskowanym hydroksyapatytem i trójfosforanem wapnia, Al_2O_3 , a także piaskowany hydroksyapatytem i trójfosforanem wapnia a następnie podwójnie trawionym. Przekładając osiągnięte wyniki na potencjał osteointegracyjny osteoblastów hodowanych na badanych powierzchniach można

założyć, że tytan piaskowany zarówno materiałami ceramicznymi jak i Al_2O_3 sprzyja różnicowaniu osteoblastów i formowaniu przez nie tkanki kostnej a także mineralizacji matriksu. Widoczny natomiast spadek aktywności fosfatazy alkalicznej dla podłoży piaskowanych a następnie trawionych może wskazywać na ograniczenie potencjału osteointegracyjnego osteoblastów hodowanych na tak przygotowanych podłożach.

Porównując natomiast wyniki stężenie białka w badanych próbkach z wynikami aktywności fosfatazy alkalicznej można zauważyć pewną zależność. Lian, Stein i Linkcs podają, że zwiększone różnicowanie osteoblastów jest poprzedzone zmniejszeniem ich proliferacji (123, 139, 140, 141). Jest to bardzo dobrze widoczne w przypadku osteoblastów hodowanych na próbkach HAS DE które charakteryzowały się bardzo wysoką produkcją białka natomiast wartości aktywności fosfatazy alkalicznej były bardzo niskie. Podobna zależność istnieje również dla grupy próbek Al_2O_3 , HA, HA DE i HAS. Osteoblasty hodowane na nich prezentowały podobne stężenia białka jednakże było ono znacząco niższe niż w przypadku podłoża HAS DE natomiast aktywność fosfatazy alkalicznej była dla tych podłoży wysoka, znacząco wyższa niż dla podłoża HAS DE. Odnosząc osiągnięte wyniki do potencjału osteointegracyjnego osteoblastów można założyć, że dla podłoży Al_2O_3 , HA, HA DE i HAS może on osiągnąć wysokie wartości.

Poszukując zależności osiągniętych wyników z organizacją i chropowatością podłoża nie udało się jej stwierdzić. Odnotowano natomiast związek między chemią powierzchni a aktywnością fosfatazy alkalicznej.

Porównując aktywność fosfatazy alkalicznej uzyskaną w hodowlach prowadzonych na wysoko ukierunkowanym podłożu maszynowym do aktywności uzyskanej z hodowli prowadzonych na wysoce nieukierunkowanych próbkach Al_2O_3 DE i HAS DE nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic.

Zdania na temat wpływu chropowatości na aktywność fosfatazy alkalicznej są podzielone. Według części autorów dochodzi do zmniejszenia aktywności fosfatazy alkalicznej w przypadku komórek hodowanych na chropowatych powierzchniach w porównaniu z powierzchniami gładkimi (135). Z kolei według innych zwiększenie chropowatości powierzchni stymuluje wzrost aktywności fosfatazy alkalicznej a więc wpływa pozytywnie na różnicowanie osteoblastów na nich hodowanych natomiast zmniejszenia chropowatości powierzchni wpływa na jej zmniejszenie (32, 57, 58, 118, 130, 136, 137).

W prezentowanych badaniach nie odnotowano podobnych zależności. Co prawda najwyższa aktywność fosfatazy alkalicznej występuje w obrębie hodowli prowadzonych na chropowatych próbkach HAS. Niższa ale mimo wszystko wyższa niż dla materiału kontrolnego aktywność fosfatazy alkalicznej występuje w obrębie jednorodnej grupy w skład której wchodzi próbki chropowate takie jak Al₂O₃, HA czy HA DE o chropowatości w granicach od Sa=507nm do Sa=712nm. Jednakże w skład drugiej grupy jednorodnej w której aktywność fosfatazy alkalicznej jest niska wchodzi próbki o chropowatości w granicach od Sa=181nm do Sa=748 (MA, Al₂O₃ DE, HAS DE). Uwagę zwraca również zmniejszenie aktywności fosfatazy alkalicznej na podłożach piaskowanych i trawionych w porównaniu z podłożami jedynie piaskowanymi. Proces trawienia w każdym przypadku doprowadził do zmniejszenia chropowatości próbek. Co prawda znaczna zmniejszenie chropowatości w przypadku podłoża HA i HA DE doprowadziło do spadku aktywności fosfatazy alkalicznej w przypadku podłoża trawionego to jednak różnica ta nie była istotna statystycznie. Natomiast bardzo niewielkie zmniejszenie parametrów chropowatości w przypadku podłoża HAS i HAS DE doprowadziło do istotnego statystycznie spadku aktywności fosfatazy alkalicznej w przypadku podłoża trawionego. Tak więc bardziej prawdopodobny wydaje się wpływ innych czynników na obniżenie aktywności fosfatazy alkalicznej w przypadku zastosowania

procedury trawienia tytanu. W związku z powyższych osiągnięte wyniki nie pozwalają na skorelowanie aktywności fosfatazy alkalicznej z chropowatością powierzchni.

Jak podaje Rausch-fana chropowatość powierzchni w połączeniu w jej hydrofilnością istotniej wpływa na różnicowanie osteoblastów niż wyłącznie sama chropowatość (130). Możliwe, że w prezentowanych badaniach istotniejszą rolę niż chropowatość odegrał czynnik który nie został zbadany tj hydrofilność czy energia powierzchniowa (47, 130, 131).

Oceniając zależność aktywności fosfatazy alkalicznej komórek hodowanych na badanych powierzchniach można zaobserwować, że najwyższa jej aktywność występuje w przypadku hodowli prowadzonych na materiałach piaskowanych zarówno materiałami ceramicznymi jak i tlenkiem glinu. I tu ponownie można obserwować brak negatywnego wpływu glinu na odpowiedź biologiczną a nawet wpływ porównywalny do tego uzyskanego dla materiałów ceramicznych. Nie odnotowano również negatywnego wpływu procesu syntezy materiału ceramicznego. Zauważalny jest również spadek aktywności fosfatazy alkalicznej w przypadku hodowli prowadzonych na materiałach piaskowanych a następnie trawionych. Możliwe, że proces trawienia usuwający z powierzchni tytanu materiał ścierny pogarsza właściwości powierzchni. Może się to odbywać również na drodze zanieczyszczenia powierzchni próbek w trakcie procesu trawienia co powoduje powstanie efektu cytotoksyczności a przynajmniej pogorszenie cytokompatybilności materiału (132, 142, 143). Istnieje również teoria mówiąca o pogrubieniu w wyniku trawienia warstwy tlenków co wpływa na zmniejszenie adhezji która w wymiarze długoczasowym odwzorowana jest w poziomie aktywności fosfatazy alkalicznej (65). Podobne wyniki osiągnął również Dos Santos odnotowując spadek różnicowania komórek wraz z usunięciem z powierzchni próbek materiału ceramicznego zarówno w postaci syntetyzowanego HA jak i TCP (128). Mniejsza aktywność fosfatazy alkalicznej w hodowlach prowadzonych na próbkach Al_2O_3 DE niż na podłożach HA DE również odpowiada wynikom uzyskanym przez innych autorów (20).

PGE2 należy do grupy mediatorów związanych z regulacją metabolizmu kości odgrywając rolę w gojeniu i formowaniu tej tkanki. PGE2 w niższych stężeniach stymuluje aktywność osteoblastów natomiast w wyższych stężeniach hamuje działanie osteoblastów stymulując aktywność osteoklastów i wiązana jest z procesem zapalnym (86, 144). Osiągnięte w prezentowanych badaniach stężenia prostaglandyny dla wszystkich badanych podłoży mieszczą się w granicach w których stężenie tej cytokiny uważane jest za osteogenne i nie osiąga wartości zapalnych (123, 144). Można więc stwierdzić, że wszystkie badane podłoża mogą generować pozytywną odpowiedź osteoblastów bez wywoływania niepożądanych reakcji. Wyniki stężenia prostaglandyny E2 dla wszystkich próbek tytanu były porównywalne. Były one również niższe niż dla materiału kontrolnego co może świadczyć o braku odpowiedzi zapalnej na tytan. Podobne wyniki uzyskał Horowitz (145). Według szeregu autorów stężenie prostaglandyny E2 wzrasta wraz ze wzrostem chropowatości podłoża (86, 123, 124, 136, 137). W prezentowanych badaniach chropowatość podłoża nie wpłynęła na zmianę stężenia prostaglandyny E2. Natomiast u Kieswettera a także Mustafy i Lincksa odnotowano zależność stężenia prostaglandyn od chropowatości podłoża (86, 123, 146). Zwiększenie chropowatości powodowało zwiększenie stężenia prostaglandyn. Jednakże w prezentowanych badaniach powierzchnie chropowate miały wyższe wartości parametry Sa (Mustafa Sa=1,3μm Lincks Ra=4,24μ) (86, 123, 146). Potwierdzają to obserwacje Batzera który podaje, że produkcję i sekrecję parakrynych i autokrynych mediatorów takich jak LTGFb i PGE2 stymuluje znaczna chropowatość powierzchni (137).

Można przypuszczać, że stężenie PGE2 nie jest związane z chemią powierzchni. W badaniach prezentowanych przez Kiesswetera stwierdzono różne stężenia tej cytokiny dla dwóch rodzajów podłoża piaskowanego Al₂O₃ a następnie podwójnie trawionego które różniły się między sobą tylko wielkością ziaren ścierniwa (86). Podobne wyniki uzyskał Schwartz który dla próbek piaskowanych Al₂O₃ a następnie trawionych a także dla próbek o powierzchni

napylanej plazmą tytanową o chropowatości Ra w granicach 4-5 μ m uzyskał podobne wyniki stężenia PGE2 (147).

Ocena żywotności komórek w kondycjonowanym medium pozwala na dynamiczną analizę interakcji badanego materiału z medium hodowlanym naśladującym płyny ustrojowe. Metoda ta pozwala prognozować jak zachowywać się będzie badany materiał przy dłuższym kontakcie z płynami ustrojowymi i jaki będzie miało to wpływ na odpowiedź biologiczną. W badaniu tym obserwujemy statystycznie istotny wzrost współczynnika żywotności wraz ze zwiększeniem rozcieńczenia kondycjonowanego medium dla każdego rodzaju medium. Najwyższy współczynnik żywotności uzyskały hodowle prowadzone na medium uzyskanym z kondycjonowania próbek Al₂O₃ DE. Najniższy natomiast współczynnik żywotności uzyskały hodowle prowadzone dla medium uzyskanego z kondycjonowania próbek HAS DE nieznacznie lepszy wynik osiągnięto dla medium uzyskanego z próbek HA DE. Na podstawie osiągniętych wyników można przypuszczać, że proces trawienia próbek piaskowanych tlenkiem glinu prowadzący do zmniejszenia zawartości glinu a także zanieczyszczeń w postaci związków węgla oraz niewielkiego zwiększenia chropowatości korzystnie wpływa na odpowiedź biologiczną ocenianą na podstawie dynamicznej interakcji z medium hodowlanym. Z kolei w przypadku próbek piaskowanych materiałami ceramicznymi proces trawienia usuwający z ich powierzchni wapń i fosfor a także zwiększający ilość zanieczyszczeń w postaci związków węgla oraz nieznacznie zmniejszający chropowatość wpływa niekorzystnie na dynamiczną interakcję próbka – medium - osteoblasty.

Zakładając, że większa ilość glinu inkorporowanego w powierzchnie tytanu zwiększa jego uwalnianie do medium hodowlanego można stwierdzić, że glin uwalniany w umiarkowanych ilościach do płynów ustrojowych może pozytywnie wpływać na żywotność komórek. Większe jego uwalnianie z materiałów bogatszych w glin podobnie wpływa na względną żywotność komórek jak kondycjonowanie medium materiałami ceramicznymi takimi jak HA

i HAS. Porównując natomiast wpływ medium kondycjonowanego próbkami HA i HAS na względną żywotność osteoblastów osiągnięto podobne wyniki co wskazuje, że proces syntezy mieszaniny HA i TCP nie wpływa na zmianę odpowiedzi biologicznej na kondycjonowane tymi materiałami medium.

Oceniając obrazy SEM utrwalonych na badanych materiałach osteoblastów stwierdzono istnienie zauważalnych różnic pomiędzy podłożami maszynowymi a chropowatymi bez zauważalnej różnicy między poszczególnymi podłożami chropowatymi. Nie stwierdzono również obecności uszkodzonych i martwych komórek co mogłoby świadczyć o negatywnym wpływie podłoża. Próbki o powierzchni maszynowej charakteryzują się powierzchnią anizotropową czyli powierzchnią o dużym ukierunkowaniu w postaci równoległych bruzd powstałych w wyniku obróbki mechanicznej. Na tych powierzchniach na obrazach SEM widoczne jest zorientowanie komórek względem organizacji powierzchni czyli występuje tzw. fenomen prowadzenia kontaktowego (contact guidance phenomenon) (33, 131, 148). Za proces ten według najnowszych badań odpowiedzialne są filopodia (149). Bruzdy obecne na powierzchni maszynowej charakteryzują się głębokością najniższego wgłębienia profilu $R_v = 2,8\mu\text{m}$ natomiast wartością całkowitej wysokości profilu (między szczytem najwyższego wierzchołka a najniższym zagłębieniem) $R_t = 6,5\mu\text{m}$. Osteoblasty orientują się zgodnie z przebiegiem tych bruzd. Podobne zorientowanie komórek względem bruzd obserwował również Chesmel, Bigerelle a także Anselme. Odnotowali oni wrażliwość osteoblastów na bruzdy głębokości od 0,6 do $5\mu\text{m}$ podczas gdy w przypadku bruzd o głębokości $0,5\mu\text{m}$ takie zorientowanie nie występowało (33, 55, 129).

W przypadku pozostałych powierzchni które charakteryzują się brakiem ukierunkowania widoczne jest rozmieszczenie komórek w sposób przypadkowy, nie zorientowany. Podobne zachowanie osteoblastów odnotowali również inni autorzy (32, 129).

W prezentowanych badaniach odnotowano związek między morfologią komórek a chropowatością podłoża. W przypadku podłoża gładkiego lub o bardzo niewielkiej chropowatości, jak ma to miejsce w przypadku powierzchni MA, komórki są płaskie, o większej powierzchni, tworzą zlewną warstwę. Natomiast na powierzchniach bardziej chropowatych kształt komórek jest bardziej kuboidalny, mają one mniejszą powierzchnię a ich rozkład jest bardziej zdeorganizowany i nie dochodzi do utworzenia całkowicie jednorodnej, zlewnej warstwy. W przypadku powierzchni gładkich kontakt hodowanych na nich komórek z podłożem jest bardziej intensywny i bliższy niż w przypadku komórek hodowanych na podłożach bardziej chropowatych. Podobne zależności odnotowano w szeregu publikacji (32, 33, 54, 123, 129, 131, 137, 150). Na powierzchniach chropowatych osteoblasty prezentują obecność licznych lamellopodi co wskazuje na większą zdolność adhezji komórek do powierzchni chropowatych w porównaniu z gładkimi. Podobne wyniki uzyskał Citeau i Anselme (32, 33, 127). Natomiast w przypadku hodowli na powierzchniach gładkich komórki prezentują znacznie bardziej rozległe wypustki cytoplazmy a także większą zdolność rozprzestrzeniania się i pokrywania hodowlanej powierzchni podobnie jak w przypadku badań Anselme (32, 33, 150).

Podsumowując można stwierdzić, że wszystkie badane powierzchnie były biokompatybilne. Na obrazach z mikroskopii skaningowej nie stwierdzono występowania uszkodzonych czy martwych komórek których obecność wskazywałaby na szkodliwy wpływ podłoża na osteoblasty. Również ocena stężenia prostaglandyny E2 nie wykazała wartości wskazujących na toczący się proces zapalny sugerujący negatywny wpływ badanych podłoży. Na wszystkich badanych materiałach obserwowano w obrazach mikroskopii elektronowej wzrastający wraz z czasem hodowli stopień pokrycia powierzchni próbki.

Model wzrostu osteoblastów pozostawał w związku z warunkami podłoża. W przypadku ukierunkowanych, gładkich podłoży osteoblasty układały się względem obecnych na

próbkach bruzd i cechowały się płaską i znacznie rozprzestrzenioną morfologią pokrywając w większym stopniu badany materiał. W przypadku powierzchni nieukierunkowanych i chropowatych komórki ułożone były w sposób przypadkowy, pokrywały w mniejszym stopniu badany materiał i cechowały się budową wyższą, bardziej kuboidalną i mniejszą rozległością.

Oceniając wpływ parametrów powierzchni badanych materiałów na odpowiedź biologiczną osteoblastów odnotowano pozytywne reakcje komórek na wszystkie powierzchnie piaskowane. Korzystne efekty były odnotowywane zarówno w przypadku próbek piaskowanych tlenkiem glinu jak i próbek piaskowanych syntetyzowanym a także niesyntetyzowanym materiałem ceramicznym. Natomiast proces trawienia osłabiał pozytywny wpływ procesu piaskowania na reakcje osteoblastów. Z kolei w przypadku próbek o powierzchni maszynowej a także piaskowanej tlenkiem glinu a następnie trawionej odpowiedź biologiczna osteoblastów była mniej korzystna.

Odnosząc natomiast osiągnięte wyniki do praktyki klinicznej a także kierunku rozwoju systemów implantologicznych można prognozować korzystny przebieg osteointegracji przy zastosowaniu implantów tytanowych o powierzchni piaskowanej wszystkimi badanymi materiałami.

7. Wnioski

1. Preparaty histologiczne nieodwapnionej kości króliczej potwierdzają istnienie bezpośredniego kontaktu tkanki kostnej z powierzchnią implantu uwidaczniając jej zrastanie z wszczepem.
2. Potwierdzono występowanie zależności między organizacją powierzchni a ułożeniem osteoblastów jak również między topografią powierzchni a morfologią osteoblastów na niej hodowanych.
3. Żaden rodzaj modyfikacji tytanu nie spowodował negatywnych reakcji hodowanych na nim osteoblastów.
4. Różnicowanie osteoblastów zależne było od przeprowadzenia procesu trawienia powierzchni tytanu natomiast proces piaskowania tytanu wpływał pozytywnie na żywotność, proliferację oraz różnicowanie komórek.
5. Zjawiska związane z reakcją osteoblastów na materiały piaskowane tlenkiem glinu, syntetyzowanymi i niesyntetyzowanymi materiałami ceramicznymi mogą prognozować korzystny przebieg osteointegracji *in vivo*.

8. Streszczenie

Współczesna implantologia dąży do otrzymania takiego rodzaju implantu który zapewniłby szybkie jego zrośnięcie z tkanką kostną pozwalając na jak najszybsze jego obciążenie. Proces łączenia tkanki kostnej z powierzchnią implantu określany jest mianem osteointegracji. Jest to proces na który istotny wpływ mają ze strony tkanki kostnej osteoblasty natomiast ze strony implantu jego powierzchnia. Dlatego też poszukiwana jest taka modyfikacja powierzchni, która pozwoliłaby na jak najkorzystniejszą odpowiedź osteoblastów zapewniającą jak najszybszy przebieg procesu osteointegracji.

Ocenę przebiegu odpowiedzi tkanki kostnej na wszczepiony materiał można przeprowadzić szeregiem sposobów między innymi za pomocą preparatów histologicznych obrazujących przekrój połączenia implant-kość. Ocenę tą można również przeprowadzić za pomocą hodowli komórek kostnych prowadzonych na materiałach planowanych jako materiały implantacyjne co pozwala na prognozę interakcji implant-kość *in vivo*.

Celem prezentowanej pracy była ocena interakcji pomiędzy powierzchnią implantu, a tkanką kostną w przebiegu procesu osteointegracji z wykorzystaniem modelu zwierzęcego oraz hodowli ludzkich osteoblastów.

W pracy, w ramach badań wstępnych, przedstawiono technikę przygotowania preparatów histologicznych nieodwapnionej tkanki kostnej i implantu tytanowego umożliwiającą ocenę procesu osteointegracji tytanowych wszczepów śródkostnych przy użyciu mikroskopii świetlnej. Z obiektywnych względów badania te nie mogły jednak być kontynuowane.

Badania zasadnicze natomiast dotyczyły oceny reakcji ludzkich osteoblastów na modyfikowane powierzchnie tytanu celem prognozy przebiegu osteointegracji *in vivo*. Badano 7 różnych powierzchni czystego komercyjnie tytanu. Powierzchnię maszynową, piaskowaną Al_2O_3 , piaskowaną Al_2O_3 i trawionej mieszaniną kwasów HCl/H_2SO_4 ,

piaskowaną mieszaniną HA/TCP, piaskowaną mieszaniną HA/TCP i trawioną mieszaniną kwasów HCl/H₂SO₄, piaskowaną mieszaniną synteryzowanego HA/TCP a także piaskowaną mieszaniną synteryzowanego HA/TCP i trawioną mieszaniną kwasów HCl/H₂SO₄. Badane powierzchnie poddano analizie topografii, chropowatości, a także składu chemicznego. Następnie przy użyciu hodowli ludzkich osteoblastów oceniano odpowiedź biologiczną na badane powierzchnie. Oceniana była morfologia komórek na podstawie obrazów mikroskopii elektronowej utrwalonych próbek. Natomiast przy pomocy analiz biochemicznych oceniano żywotność komórek, zawartości białka, aktywności fosfatazy alkalicznej, stężenia prostaglandyny E₂ w hodowlach, a także oceniano wzrost komórek w długo kondycjonowanym badanymi materiałami medium hodowlanym.

Uzyskane preparaty histologiczne wykazały obecność bezpośredniego kontaktu tkanki kostnej z powierzchnią implantu uwidaczniając jej zrastanie z wszczepem. Natomiast badania z użyciem hodowli ludzkich osteoblastów wykazały brak negatywnego oddziaływania wszystkich badanych próbek na hodowane na nich osteoblasty co pozwalałoby na użycie ich jako wszczepy śródkostne. Analizując wpływ topografii i ukierunkowania powierzchni na reakcję komórkową stwierdzono występowanie zależności między organizacją powierzchni, a ułożeniem osteoblastów jak również między topografią powierzchni, a morfologią osteoblastów na niej hodowanych. Oceniając wpływ składu chemicznego badanych materiałów na reakcje osteoblastów stwierdzono brak niekorzystnego oddziaływania inkorporowanego w powierzchnie tytanu podczas procesu piaskowania glinu. Stwierdzono również postępujące z czasem zwiększenie żywotności osteoblastów hodowanych na powierzchniach wzbogaconych o wapń i fosfor. Odnotowano również zależność pomiędzy różnicowaniem osteoblastów a zastosowaniem procesu trawienia powierzchni tytanu.

Odnosząc natomiast osiągnięte wyniki do praktyki klinicznej można prognozować korzystny przebieg osteointegracji przy zastosowaniu wszystkich badanych materiałów piaskowanych.

9. Summary

Modern implantology seeks for an implant providing a rapid bone healing and permitting fast implant loading. Process of bone connection to implants surface is defined as osseointegration. Significant influence on this process has concerning the bone – the osteoblasts and concerning an implant – its surface. That's why an implants surfaces modification which would induce favorable osteoblasts answer resulting in accelerated osseointegration process is searched.

Evaluation of bone reaction to an implanted material may be performed by means of many procedures. One of those methods is an histological slides preparation displaying section of bone-implant connection. Other method is an bone cell culture method conducted on materials planed as implant materials. This method enables bone-implant interaction prognosis *in vivo*.

The aim of this study was an evaluation of interaction between implant surface and bone tissue during osseointegration process with use of an animal model and human osteoblasts cell culture.

In this research a technique of histological slides preparation of undecalcified bone tissue and titanium implant enabling evaluation of osseointegration process of titanium endosseous implants by means of light microscope was presented.

Main research concerned evaluation of human osteoblasts reactions on modified titanium surfaces as a prognosis of osseointegration *in vivo*.

Seven different surfaces of commercially pure titanium were evaluated. Machined surface, Al₂O₃ blasted surface, Al₂O₃ blasted and double etched with HCl/H₂SO₄ surface, HA/TCP blasted surface, HA/TCP blasted and double etched with HCl/H₂SO₄ surface, sintered HA/TCP blasted surface and sintered HA/TCP blasted and double etched with HCl/H₂SO₄ surface. Those surfaces were submitted an topographic, roughness and chemical composition

evaluation. Then, by the means of human osteoblasts cell cultures, a biological reaction on tested surfaces was examined. Cells morphology on the base of scanning microscope images of fixed samples was examined. By the means of biochemical analysis cells viability, protein concentration, phosphate alkaline activity, prostaglandin E2 concentration in cell cultures was evaluated. Cells growth in titanium samples conditioned medium was also evaluated.

Achieved histological slides revealed an direct bone tissue contact with implant surface indicating bone growing within implant surface. Human osteoblasts cell cultures revealed no negative effect of all tested materials on cultured cells what would allow applying those materials as endosseous implants. Analysis of surfaces topography and organization on cell reaction revealed an relationship between cells arrangement and surfaces organization as well as between cells morphology and surfaces topography. Evaluating an influence of surfaces chemical composition on osteoblasts reactions no negative effect of aluminum incorporated into titanium surface during blasting process was observed. Osteoblasts viability increase during time was observed in cultures conducted on titanium surfaces enriched with calcium and phosphorus. Relationship between osteoblasts differentiation and applying titanium surfaces etching process was also observed.

Referring achieved results to clinical practice a favorable coarse of osseointegration process with use of all blasted titanium surfaces can be predict.

10. Piśmiennictwo

1. Koeck B., Wagner W.: Implantologia. Urban & Partner, Wrocław 2004
2. Łomżyński Ł., Mierzwińska-Nastalska E., Kłodkowska-Dobrucka M.: Implanty śródkostne w leczeniu protetycznym – ewolucja implantologii. *Protet. Stomatol.* 2012, LXII, 4, 244-251
3. Brånemark P.-I., Adell R., Breine U., Hansson B.O., Lindstrom J., Ohlsson A: Intra-osseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies. *Scand. J. Plastic. Reconstruct Surg* 196, 3, 81-100
4. Brandt H.H.: Wprowadzenie do implantologii. Elsevier Urban & Partner, Wrocław 1998
5. Majewski P., Gronkiewicz K., Majewski S.: Praktyczne aspekty tkankowej integracji tytanowych wszczepów dentystycznych. *Implantoprotetyka* 2011, XII, 3-4, 44-45, 44-47
6. Majewski S., Malisz P., Dutkiewicz J., Majewski P., Janus A.: Badanie struktur powierzchniowych niezintegrowanych implantów dentystycznych (Biomet 3i, Osteoplant HEX) z zastosowaniem mikroskopii elektronowej i rentgenowskiej analizy spektrometrycznej. *Implantoprotetyka* 2010, XI, 4, 41, 2-10
7. Jokstad A., Braegger U., Brunski J., Rochester A., Naert I., Wennerberg A.: Quality of dental implants. *International Dental Journal* 2003, 53, 6, 409-443
8. Gronkiewicz K., Majewski S., Majewski P., Wiśniewska G.: Optymalizacja techniki zabiegów implantoprotetycznych z użyciem tytanowych i cyrkonowych wszczepów jednoczęściowych w aspekcie ochrony tkankowych struktur okołointplantacyjnych. *Implantoprotetyka* 2011, XII, 1-2, 42-43, 4-8
9. Gronkiewicz K., Majewski s., Majewski P.: Przewodnictwo cieplne implant-kość i metody pomiaru temperatury generowanej w trakcie zabiegów implantoprotetycznych. *Implantoprotetyka* 2009, X, 4, 37, 17-21
10. Pryliński M., Limanowska-Shaw H.: właściwości tytanu i problem nadwrażliwości na ten metal. *Implantoprotetyka* 2007, 8, 4, 50-52
11. Albrektsson T., Branemark P.I., Hansson H.A., Lindstrom J.: Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a longlasting, direct bone-to-implant anchorage in man. *Acta Orthopaedica Scandinavica* 1981, 52, 155–170

12. Maciejewska I., Nowakowska J., Bereznowski Z.: Osteointegracja wszczepów zębowych – etapy gojenia kości Praca poglądowa. *Protet. Stomatol.* 2006, LVI, 3, 214-219
13. Majewski P.: Analiza czynników warunkujących kwalifikację do leczenia według procedury natychmiastowego obciążania wszczepów filarowych konstrukcją protetyczną. *Implantoprotetyka* 2011, XII, 3-4, 44-45 18-22
14. Stupka M., Majewski P.: Poimplantacyjna stabilizacja wtórna wszczepów filarowych jako jeden z elementów oceny warunków do rozpoczęcia etapu zaopatrzenia protetycznego – możliwe powikłania. *Implantoprotetyka* 2009, X, 4, 37, 14-16
15. Takebe J., Itoh S., Okada J., Ishibashi K.: Anodic oxidation and hydrothermal treatment of titanium results in a surface that causes increased attachment and altered cytoskeletal morphology of rat bone marrow stromal cells *in vitro*. *J. Biomed. Mater. Res.* 2000, 5, 51, 3, 398-407
16. Larsson C., Thomsen P., Lausmaa J., Rodahl M., Kasemo B., Eriksson L.E.: Bone response to surface-modified titanium implants: Studies on electropolished implants with different oxide thickness and morphology. *Biomaterials* 1994, 15, 1062–1074
17. Palmquist A., Omar O. M., Esposito M., Lausmaa J., Thomsen P.: Titanium oral implants: surface characteristics, interface biology and clinical outcome. *J. R. Soc. Interface* 2010, 7, S515–S527
18. Wennerberg A., Albrektson T.: Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review. *Clin. Oral Implants Res.* 2009, 20, 4, 172-184
19. Kasemo B., Lausmaa J.: Surface science aspects on inorganic biomaterials. In: *Critical Reviews in Biocompatibility*, vol 2. New York: Elsevier, 1986, 335–380
20. Le Guéhennec L., Soueidan A., Layrolle P., Amouriq Y.: Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dent. Mater.* 2007, 23, 844-854
21. Schwartz Z., Martin J.Y., Dean D.D., Simpson J., Cochran D.L., Boyan B.D.: Effect of titanium surface roughness on chondrocyte proliferation, matrix production, and differentiation depends on the state of cell maturation. *J. Biomed. Mater. Res.* 1996, 30, 145–155
22. 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.* 2006, 27, 21, 4003-4015

23. Consensus Conference of the European Society for Biomaterials, Chester, England, March 1986
24. Barradas A.M.C., Yuan H., van Blitterswijk C.A., Habibovic P.: Osteoinductive biomaterials: current knowledge of properties, experimental models and biological mechanisms. *European Cells and Materials* 2011, 21, 407 - 429
25. Khan S.N., Cammisa F.P., Sandhu H.S., Diwan A.D., Girardi F.P., Lane J.M.: The biology of bone grafting. *J. Am. Acad. Orthop. Surg.* 2005, 13, 1, 77-86
26. Narang S., Chava V.. Biomaterials used as bone graft substitutes. *Annal Dent. Univ. Malaya* 2000,; 7, 36-42
27. Brånemark P.I., Zarb G.A., Albrektsson T.: *Tissue – Integrated Prostheses. Osseointegration in Clinical Dentistry.* Quintessence Publishing Co., Chicago, IL, 1985
28. Albrektsson T.: Hard tissue implant interface. *Australian Dental Journal* 2008; 53, 1, S34–S38
29. Meyer U., Büchter A., Wiesmann H.P., Joos U., Jones D.B.: Basic reactions on osteoblasts on structured material surfaces. *European Cell and Materials* 2005, 9, 39-49
30. Anselme K.: Osteoblast adhesion on biomateriale. *Biomaterials* 2000, 21 667-681
31. Bigerelle M., Anselme K.: Statistical correlation between cell adhesion and proliferation on biocompatible metallic materials. *J. Biomed. Mater. Res.* 2005, 72A, 36–46
32. Anselme K., Bigerelle M.: Topography effects of pure titanium substrates on human osteoblast long-term adhesion. *Acta Biomaterialia* 2005, 1, 211–222
33. Anselme K., Bigerelle M., Noel B., Dufresne E., Judas D., Iost A., Hardouin P.: Qualitative and quantitative study of human osteoblasts adhesion on materials with various surface roughnesses. *Biomed. Mater. Res.* 2000, 49, 155–166
34. Majewski S., Majewski P.: Biologiczne mechanizmy przebudowy struktur kostnych i gojenia tkanek miękkich jamy ustnej po zabiegach implantacyjnych. *Implantoprotetyka* 2009, X, 1, 34, 3-7
35. Cano-Sanchez J., Campo-Trapero J., Gonzalo-Lafuente J.C., Moreno-López L. A., Bascones-Martínez A.: Undecalcified bone samples: a description of the technique and its utility based on the literature. *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal.* 2005, 10, E74-E87

36. Meredith N.: A review of nondestructive test methods and their application to measure the stability and osseointegration of bone anchored endosseous implants. *Crit. Rev. Biomed. Eng.* 1998, 26, 4, 275-291
37. Aparicio C., Lang N.P., Rangert B.: Validity and clinical significance of biomechanical testing of implant/bone interface. *Clin Oral Implants Res.* 2006 , 17, 2, 2-7
38. Sykaras N., Iacopino A.M., Marker V.A., Triplett R.G., Woody R.D.: Implant materials, designs, and surface topographies: their effect on osseointegration. A literature review. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants.* 2000, 15, 5, 675-690
39. Salvi G.E., Lang N.P.: Diagnostic parameters for monitoring peri-implant conditions. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants.* 2004, 19, 116-127
40. Atsumi M., Park S.H., Wang H.L.: Methods used to assess implant stability: current status. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants.* 2007, 22, 5, 743-754
41. Meredith N.: Assessment of implant stability as a prognostic determinant. *Int. J. Prosthodont.* 1998, 11, 5, 491-501
42. Wojtowicz A., Chaberek S., Kryst L., Urbanowska E., Ciechowicz K., Ostrowski K.: Fourier and fractal analysis of maxillary alveolar ridge repair using platelet rich plasma (PRP) and inorganic bovine bone. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 2003, 32, 84–86
43. Wojtowicz A., Chaberek S., Pirino A., Montella A., Bandiera P., Kinsner A., Ostrowski K.: The trabecular structure of developing human mandible. *Clin Orthod Res* 2001, 4, 161–171
44. Hanks C., Watahaz J.C, Suni Z.: *In vitro* models of biocompatibility: A review. *Dent. Mater.* 1996, 12, 186-193
45. Schmalz G.: Concepts in biocompatibility testing of dental restorative materials. *Clin. Oral Invest.* 1997, 1, 154–162
46. Vandrovcová M., Bačáková L.: Adhesion, Growth and Differentiation of Osteoblasts on Surface-Modified Materials Developed for Bone Implants. *Physiol. Res.* 2011, 60, 403-417
47. Stodolak E.: Badania nad modyfikacją powierzchniową i wpływem włókien na materiał polimerowy i odpowiedź komórkową. Rozprawa doktorska. Kraków 2006
48. Łukaszewska M., Gajdus P., Hędzulek W., Zagalak R.: Rozwój powierzchni wszczepów tytanowych. *Przegląd piśmiennictwa. Implantoprotetyka* 2009, 3, 24-29

49. Pryliński M., Prylińska A.: Sposoby kondycjonowania metalowych elementów retencyjnych mostów adhezyjnych – przegląd piśmiennictwa. *Dental Forum* 2009, 1, 77-82
50. Bacakova L., Filova E., Parizek M., Ruml T., Svorcik V.: Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants *Biotechnology Advances* 2011, 29, 739–767
51. Ponche A., Bigerelle M., Anselme K.: Relative influence of surface topography and surface chemistry on cell response to bone implant materials. Part 1: Physico-chemical effects. *Proc. I. Mech. E.* 2010, Vol. 224 Part H: *J. Engineering in Medicine* 2010, 17, 1471- 1486
52. Bigerelle M., Anselme K. , Dufresne E., Hardouin P., Iost A.: An unscaled parameter to measure the order of surfaces: a new surface elaboration to increase cells adhesion. *Biomolecular Engineering* 2002, 19, 79-83
53. Anselme K., Ponche A., Bigerelle M.: Relative influence of surface topography and surface chemistry on cell response to bone implant materials. Part 2: biological aspects *Proc. I. Mech. E. Part H: J. Engineering in Medicine* 2010, 224, 1487-1507
54. Lauer G., Wiedmann-Al-Ahmad M., Otten J.E., Hübner U., Schmelzeisen R., Schilli W.: The titanium surface texture effects adherence and growth of human gingival keratinocytes and human maxillar osteoblast-like cells *in vitro*. *Biomaterials*. 2001, 22, 20, 2799-2809
55. Chesmel K.D., Clark C.C., Brighton C.T., Black J.: Cellular responses to chemical and morphologic aspects of biomaterial surfaces. II. The biosynthetic and migratory response of bone cell populations. *J. Biomed. Mater. Res.* 1995, 29, 1101–1110
56. Hamilton D. W., Chehroudi B., Brunette D. M.: Comparative response of epithelial cells and osteoblasts to microfabricated tapered pit topographies *in vitro* and *in vivo*. *Biomaterials* 2007, 28, 2281–2293
57. Schwartz Z., Lohmann C.H., Oefinger J., Bonewald L.F., Dean D.D., Boyan B.D.: Implant surface characteristics modulate differentiation behavior of cells in the osteoblastic lineage. *Adv. Dent. Res.* 1999, 13, 38–48
58. Kim M.J., Kim C.W., Lim Y.J., Heo S.J.: Microrough titanium surface affects biologic response in MG63 osteoblast-like cells. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 2006, 79, 1023–1032

59. Giordano C., Sandrini E., Busini V., Chiesa R., Fumagalli G., Giavaresi G.: A new chemical etching process to improve endosseous implant osseointegration: *in vitro* evaluation on human osteoblastlike cells. *Int. J. Artif. Organs.* 2006, 29, 772–780
60. Li L.H., Kong Y.M., Kim H.W., Kim Y.W., Kim H.E., Heo S.J: Improved biological performance of Ti implants due to surface modification by micro-arc oxidation. *Biomaterials* 2004, 25, 2867–2875
61. Xavier S.P., Carvalho P.S., Beloti M.M., Rosa A.L.: Response of rat bone marrow cells to commercially pure titanium submitted to different surface treatments. *J. Dent* 2003, 31, 173–180
62. Kim M.J., Choi M.U., Kim C.W.: Activation of phospholipase D1 by surface roughness of titanium in MG63 osteoblast-like cell. *Biomaterials* 2006, 27, 5502–11
63. Bowers K.T., Keller J.C., Randolph B.A., Wick D.G., Michaels C.M.: Optimization of surface micromorphology for enhanced osteoblast responses *in vitro*. *Int. J. Oral. Maxillofac. Implants.* 1992, 7, 3, 302-310
64. 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.* 2006, 27, 21, 4003-4015
65. Anselme M., Bigerelle K. Statistical demonstration of the relative effect of surface chemistry and roughness on human osteoblast short-term adhesion. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2006. 17, 471–479
66. Zareidoost A., Yousefpour M., Ghaseme B., Amanzadeh A.: The relationship of surface roughness and cell response of chemical surface modification of titanium. *J. Mater. Sci: Mater. Med.* 2012, 23, 1479–1488
67. Kochanowska I., Chaberek S., Wojtowicz A., Marczyński B., Włodarski K., Dytko M., Ostrowski K.: Expression of genes for bone morphogenetic proteins BMP-2, BMP-4 and BMP-6 in various parts of the human skeleton. *BMC Musculoskeletal Disorders* 2007, 8, 128- 138
68. Esposito M., Hirsch J.M., Lekholm U., Thomsen P.: Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implants. (II). Etiopathogenesis. *Eur. J. Oral. Sci.* 1998, 106, 721–764

69. Toni A., Lewis C.G., Sudanese A., Stea S., Calista F., Savarino L., Pizzoferrato A., Giunti A.: Bone demineralization induced by cementless alumina-coated femoral stems. *J. Arthroplasty* 1994, 9, 435–444
70. Savarino L., Cenni E., Stea S., Donati M.E., Paganetto G., Moroni A., Toni A., Pizzoferrato A.: X-ray diffraction of newly formed bone close to alumina or hydroxyapatite-coated femoral stem. *Biomaterials* 1993, 14, 900–905
71. Darwell B.W., Samman N., Luk W.K., Clark R.K., Tideman H.: Contamination of titanium castings by aluminium oxide blasting. *J. Dent.* 1995, 23, 319–322
72. Gbureck U., Masten A., Probst J., Thull R.: Tribochemical structuring and coating of implant metal surfaces with titanium oxide and hydroxyapatite layers. *Mat. Sci. Eng. C* 2003, 23, 461–465
73. Sader M.S., Balduino A., Soares Gde A., Borojevic R.: Effect of three distinct treatments of titanium surface on osteoblast attachment, proliferation, and differentiation. *Clin. Oral. Impl. Res.* 2005, 16, 667–675
74. Piatelli A., Degidi M., Paolantonio M., Mangano C., Scarano A.: Residual aluminium oxide on the surface of titanium implants has no effect on osseointegration. *Biomaterials* 2003, 24, 4081–4089
75. Wennerberg A., Albrektsson T., Johansson C., Andersson B.: Experimental study of turned and grit-blasted screw-shaped implants with special emphasis on effects of blasting material and surface topography. *Biomaterials* 1996, 17, 15–22
76. Ivanoff C.J., Widmark G., Johansson C., Wennerberg A.: Histologic evaluation of bone response to oxidized and turned titanium micro-implants in human jawbone. *Int. J. Oral. Maxillofac. Impl.* 2003, 18, 341–348
77. Sul Y.T., Johansson C., Wennerberg A., Cho L.R., Chang B.S., Albrektsson T.: Optimum surface properties of oxidized implants for reinforcement of osseointegration: surface chemistry, oxide thickness, porosity, roughness, and crystal structure. *Int. J. Oral. Maxillofac. Impl.* 2005, 20, 349–359
78. Sikorska B.: Ocena wybranych metod mechanicznej i chemicznej modyfikacji powierzchni tytanu stosowanego w implantologii. Rozprawa doktorska. Poznań 2005. Akademia Medyczna im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu
79. Wennerberg A., Albrektsson T.: Suggested Guidelines for the Topographic Evaluation of Implant Surfaces. *Int. Oral Maxillofac. Implants* 2000, 15, 331–344

80. Cory A.H., Owen T.C., Barltrop J.A., Cory J.G.: Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer. Commun.* 1991, 3, 7, 207-212
81. Berridge M.V., Herst P.M., Tan A.S.: Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol. Annu. Rev.* 2005, 11, 127-152
82. Goodwin C.J., Holt S.J., Downes S., Marshall N.J.: Microculture tetrazolium assays: a comparison between two new tetrazolium salts, XTT and MTS. *J. Immunol. Methods.* 1995, 13, 179, 1, 95-103
83. Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J., Klenk D.C.. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 1985, 150, 76-85
84. Le Guehennec L., Lopez-Heredia M.A., Enkel B., Weiss P., Amouriq Y., Layrolle P.: Osteoblastic cell behaviour on different titanium implant surfaces. *Acta Biomater.* 2008, 4, 3, 535-543
85. Zao G., Raines A.L., Wieland M., Schwartz Z., Boyan B.D.: Requirement for Both Micron and Submicron Scale Structure for Synergistic Responses of Osteoblasts to Substrate Surface Energy and Topography. *Biomaterials* 2007, 28, 18, 2821–2829
86. Kieswetter K., Schwartz Z., Hummert T.W., Cochran D.L., Simpson J., Dean D. D., Boyan B.D.: Surface roughness modulates the local production of growth factors and cytokines by osteoblast-like MG-63 cells. *Journal of Biomedical Materials Research* 1996, 32, 55-63
87. Stout KJ, Davis EJ, Sullivan PJ. *Atlas of Machined Surfaces.* London: Chapman and Hall, 1990.
88. McCracken M.: Dental implant materials: commercially pure titanium and titanium alloys. *J. Prosthodont.* 1999, 8, 40–43
89. Roza A.L., Crippa G.E., de Oliveira P.T., Taba Jr M., Lefebvre L.P., Beloti M.M.: Human alveolar bone cell proliferation, expression of osteoblastic phenotype, and matrix mineralization on porous titanium produced by powder metallurgy. *Clin. Oral Impl. Res.* 2009, 20, 472–481
90. Schwartz Z., Raz P., Zhao G., Barak Y., Tauber M., Yao H., Boyan B.D. Effect of Micrometer-Scale Roughness of the Surface of Ti6Al4V Pedicle Screws *in Vitro* and *in Vivo*. *J. Bone. Joint. Surg. Am.* 2008, 01, 90, 11, 2485-2498

91. Donath K., Breuner G.: A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. The Säge-Schliff (sawing and grinding) technique. *J. Oral Pathol.* 1982, 11, 4, 318-326
92. Piattelli M., Scarano A., Paolantonio M., Iezzi G., Petrone G., Piattelli A.: Bone response to machined and resorbable blast material titanium implants: an experimental study in rabbits. *J. Oral Implantol.* 2002, 28, 1, 2-8
93. Piattelli A., Manzon L., Scarano A., Paolantonio M., Piattelli M.: Histologic and histomorphometric analysis of the bone response to machined and sandblasted titanium implants: an experimental study in rabbits. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants.* 1998, 13, 6, 805-810.
94. Cordioli G., Majzoub Z., Piattelli A., Scarano A.: Removal torque and histomorphometric investigation of 4 different titanium surfaces: an experimental study in the rabbit tibia. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* 2000, 15, 5, 668-674
95. Mohammadi S., Esposito M., Hall J., Emanuelsson L., Krozer A., Thomsen P.: Long-term bone response to titanium implants coated with thin radiofrequency magnetron-sputtered hydroxyapatite in rabbits. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* 2004, 19, 4, 498-509
96. Hayakawa T., Takahashi .K, Yoshinari M., Okada H., Yamamoto H., Sato M., Nemoto K.: Trabecular bone response to titanium implants with a thin carbonate-containing apatite coating applied using the molecular precursor method. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants.* 2006, 21, 6, 851-858
97. London R.M., Roberts F.A., Baker D.A., Rohrer M.D., O'Neal R.B.: Histologic comparison of a thermal dual-etched implant surface to machined, TPS, and HA surfaces: bone contact *in vivo* in rabbits. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* 2002, 17, 3, 369-376
98. Ellingsen J.E., Johansson C.B., Wennerberg A., Holmén A.: Improved retention and bone-to-implant contact with fluoride-modified titanium implants. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* 2004, 19, 5, 659-666
99. Park J.W., Lee S.G., Choi B.J., Suh J.Y.: Effects of a cell adhesion molecule coating on the blasted surface of titanium implants on bone healing in the rabbit femur. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* 2007, 22, 4, 533-541

100. Park Y.S., Yi K.Y., Lee I.S., Han C.H., Jung Y.C.: The effects of ion beam-assisted deposition of hydroxyapatite on the grit-blasted surface of endosseous implants in rabbit tibiae. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* 2005, 20, 1, 31-38
101. Park J.M., Koak J.Y., Jang J.H., Han C.H., Kim S.K., Heo S.J.: Osseointegration of anodized titanium implants coated with fibroblast growth factor-fibronectin (FGF-FN) fusion protein. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* 2006, 21, 6, 859-866
102. Kim Y.H., Koak J.Y., Chang I.T., Wennerberg A., Heo S.J.: A histomorphometric analysis of the effects of various surface treatment methods on osseointegration. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* 2003, 18, 3, 349-356
103. Schwarz F., Herten M., Sager M., Wieland M., Dard M., Becker J.: Histological and immunohistochemical analysis of initial and early osseous integration at chemically modified and conventional SLA titanium implants: preliminary results of a pilot study in dogs. *Clin. Oral Implants Res.* 2007, 18, 4, 481-488
104. Linder J.E., Longhurst P., Johnson N.W.: A paraffin-celloidin embedding method for studying soft-hard tissue interfaces. *Arch. Oral Biol.* 1981, 26, 9, 753-755
105. van der Lubbe H.B., Klein C.P., de Groot K.: A simple method for preparing thin (10 microM) histological sections of undecalcified plastic embedded bone with implants. *Stain Technol.* 1988, 63, 3, 171-176
106. Glauert A.M.: Practical methods in electron microscopy. Fixation, dehydration and embedding of biological specimens. North-Holland. 1975
107. Glauert A.M.: Practical methods in electron microscopy. Specimen preparation in material science. Electron diffraction and optical diffraction technique. North – Holland. 1972
108. Keller J.C., Stewart M., Roehm M., Schneider G.B: Osteoporosis-like bone conditions affect osseointegration of implants. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2004, 19, 5, 687-694
109. Linder L.: High-resolution microscopy of the implant-tissue interface. *Acta Orthop Scand.* 1985, 56, 3, 269-272
110. Thomsen P., Ericson L.E.: Light and transmission electron microscopy used to study the tissue morphology close to implants. *Biomaterials* 1985, 6, 6, 421-424
111. Bjursten L.M., Emanuelsson L., Ericson L.E., Thomsen P., Lausmaa J., Mattsson L., Rolander U., Kasemo B.: Method for ultrastructural studies of the intact tissue-metal interface. *Biomaterials* 1990, 11, 8, 596-601

112. Hipp J.A., Brunski J.B., Cochran G.V.: Method for histological preparation of bone sections containing titanium implants. *Stain Technol.* 1987, 62, 4, 247-252
113. Schroeder A., Sutter F., Buser D., Krekeler G.: *Oral implantology*, Thieme Medical Publishers, Inc. New York 1996
114. Gotfredsen K., Budtz-Jørgensen E., Jensen L.N.: A method for preparing and staining histological sections containing titanium implants for light microscopy. *Stain Technol.* 1989, 64, 3, 121-127
115. Rohrer M.D., Schubert C.C.: The cutting-grinding technique for histologic preparation of undecalcified bone and bone-anchored implants. Improvements in instrumentation and procedures. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* 1992, 74, 1, 73-78
116. Puleo D.A., Nanci, A. Understanding and controlling the bone-implant interface. *Biomaterials* 1999, 20, 2311–2321
117. Brunski J.B., Puleo D.A., Nanci A.: Biomaterials and biomechanics of oral and maxillofacial implants: current status and future developments. *Int. J. Oral. Maxillofac. Impl.* 2000, 15, 15–46
118. Bachle 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. *Clin. Oral. Impl. Res.* 2004, 15, 683–692
119. Sinha R.K., Morris F., Shah S.A., Tuan R.S.: Surface composition of orthopaedic implant metals regulates cell attachment, spreading, and cytoskeletal organization of primary human osteoblasts *in vitro*. *Clin. Ortho. Related Res.* 1994, 305, 258-272
120. Mustafa K., Wroblewski J., Hultenby K., Lopez B.S., Arvidson K.K.: Effects of titanium surfaces blasted with TiO₂ particles on the initial attachment of cells derived from human mandibular bone. A scanning electron microscopic and histomorphometric analysis. *Clin. Oral. Implant Res.* 2000, 11, 2, 116-128
121. Keller J.C., Schneider G.B., Stanford C.M., Kellogg B.J.: Effects of implant microtopography on osteoblast cell attachment. *Implant Dent.* 2003, 12, 2, 175-181
122. Anselme K., Linez P., Bigerelle M., Le Maguer D., Le Maguer A., Hardouin P., Hildebrand H.F., Iost A., Leroy J.M.: The relative influence of the topography and chemistry of TiAl₆V₄ surfaces on osteoblastic cell behavior. *Biomaterials* 2000, 21, 1567-1577

123. Lincks J., Boyan B.D., Blanchard C.R., Lohmann C.H., Liu Y., Cochran D.L., Dean D.D., Schwartz Z.: Response of MG63 osteoblast-like cells to titanium and titanium alloy is dependent on surface roughness and composition. *Biomaterials* 1998, 19, 23, 2219-2232
124. Martin J.Y., Schwartz Z., Hummert T.W., Schraub D.M., Simpson J., Lankford J., Dean D.D., Cochran D.L., Boyan B.D. Effects of titanium surface roughness on proliferation, differentiation, and protein synthesis of human osteoblast-like cells (MG63) *J. Biomed. Mater. Res.* 1995, 29, 389–401
125. Degasne I, Basl M.F., Demais V., Hure G., Lesourd M., Grolleau B., Mercier L., Chappard D. Effects of roughness, fibronectin and vitronectin on attachment, spreading, and proliferation of human osteoblast-like cells (Saos-2) on titanium surfaces. *Calcif Tissue Int* 1999, 64, 499–507
126. Brett P.M., Harle J., Salih V., Mihoc R., Olsen I., Jones F.H., Tonetti M.: Roughness response genes in osteoblasts. *Bone* 2004, 35, 124–133
127. Citeau A., Guicheux J., Vinatier C., Layrolle P., Nguyen T.P., Pilet P., Daculsi G.: *In vitro* biological effects of titanium rough surface obtained by calcium phosphate grid blasting. *Biomaterials* 2005, 26, 157–165
128. dos Santos E.A., Farina M., Soares G.A., Anselme K.: Chemical and topographical influence of hydroxyapatite and b-tricalcium phosphate surfaces on human osteoblastic cell behavior. *J. Biomed. Mater. Res.* 2009, 89A, 510–520
129. Bigerelle M., Anselme K., Noel B., Ruderman I., Hardouin P., Iost A.: Improvement in the morphology of Ti-based surfaces: a new process to increase *in vitro* human osteoblast response. *Biomaterials* 2002, 23, 1563–1577
130. Rausch-fana X., Qu Z., Wieland M., Matejkaa M., Schedle A.: Differentiation and cytokine synthesis of human alveolar osteoblasts compared to osteoblast-like cells (MG63) in response to titanium surfaces. *Dental Materials* 2008, 24, 102–110
131. Rebl H., Finke B., Lange R., Weltmann K.D., Nebe J.B Impact of plasma chemistry versus titanium surface topography on osteoblast orientation. 2012, 8, 10, 3840-3851
132. Canabarro A., Paiva C., Ferreira H., Tholt-De-Vasconcellos B., De-Deus G., Prioli R., Linhares A.B.R., Alves G.G., Granjeiro J.: Short-Term Response of Human Osteoblast-Like Cells on Titanium Surfaces With Micro- and Nano-Sized Features. *Scanning*. Vol. 2012, 00, 1-9

133. Eglin S., Ali C.C., Perry J.: Comparative study of the *in vitro* apatite-forming ability of poly(epsilon-caprolactone)-silica sol-gels using three osteoconductivity tests (static, dynamic, and alternate soaking process). *Biomed. Mater. Res.* 2004, 69, 718-727
134. Engelberg I., Kohn J.: Physico-mechanical properties of degradable polymers used in medical applications: a comparative study. *Biomaterials* 1991, 12, 292-304
135. De Santis D., Guerriero C., Armato U., Nocini P.F., Richards G., Gotte P.: Adult human bone cells from jaw bones cultured on plasma-sprayed or polished surfaces of titanium or hydroxylapatite discs. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 1996, 7, 21–28
136. Boyan B.D, Bonewald L.F., Paschalis E.P., Lohmann C.H., Rosser J., Cochran D.L., Dean D.D., Schwartz Z., Boskey A.L.: Osteoblast-Mediated Mineral Deposition in Culture is Dependent on Surface Microtopography. *Calcif. Tissue Int.* 2002, 71, 519–529
137. Batzer R., Liu Y., Cochran D.L., Szmuckler-Moncler S., Dean D.D., Boyan B.D., Schwartz Z.: Prostaglandins mediate the effects of titanium surface roughness on MG63 osteoblast-like cells and alter cell responsiveness to 1 alpha,25-(OH)2D3. *Biomed. Mater. Res.* 1998, 41, 489–496
138. Lossdorfer S., Schwartz Z., Wang L., Lohmann C.H., Turner J.D., Wieland M. Cochran D.L., Boyan B.D.: Microrough implant surface topographies increase osteogenesis by reducing osteoclast formation and activity. *J. Biomed. Mater. Res.* 2004, 70A, 361-369
139. Stein G.S., Lian B.T., Owen T.A.: Relationship of cell growth to the regulation of tissue-specific gene expression during osteoblast differentiation,” *FASEB J.* 1990, 4, 3111-3123
140. Lian J.B., Stein G.S.: The developmental stages of osteoblast growth and differentiation exhibit selective responses of genes to growth factors (TGFP1) and hormones (vitamin D and glucocorticoids). *J. Oral Implantol.* 1993, 19, 95-105
141. Lian J.B., Stein G.S.: Concepts of osteoblast growth and differentiation: Basis for modulation of bone cell development and tissue formation. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 1992, 3, 269-305
142. Anselme K, Bigerelle M. Effect of a gold-palladium coating on the long-term adhesion of human osteoblasts on biocompatible metallic materials. *Surf. Coating. Tech.* 2006, 200, 6325– 6330

143. Carvalho D.R., Carvalho P.S.P., Magro Filho O., de Mello J.D., Beloti M.M., Rosa A.L. Characterization and *in vitro* cytocompatibility of an acid-etched titanium surface. *Braz. Dent. J.* 2010, 21, 3–11
144. Raisz L.G., Fall P.M.: Biphasic effects of prostaglandin E2 on bone formation in cultured fetal rat calvariae: interaction with cortisol. *Endocrinology* 1990;126:1654-1659
145. Horowitz S.M., Gonzales J.B.: Inflammatory response to implant particulates in a macrophage/osteoblast coculture model. *Calcif. Tissue Int.* 1996, 59, 392–396
146. Mustafa K., Rubinstein J., Silva Lopez B., Arvidson K.: Production of transforming growth factor β 1 and prostaglandin E2 by osteoblast-like cells cultured on titanium surfaces blasted with TiO₂ particles. *Clin. Oral Impl. Res.* 2003, 14, 50–56
147. Schwartz Z., Lohmann C.H., Sisk M., Cochran D.L., Sylvia V.L., Simpson J., Dean D.D., Boyan B.D.: Local factor production by MG63 osteoblast-like cells in response to surface roughness and 1,25-(OH)₂D₃ is mediated via protein kinase C- and protein kinase A-dependent pathways. *Biomaterials* 2001, 22, 731-741
148. Walboomers X.F., Jansen J.A.: Cell and tissue behavior on micro-grooved surfaces. *Odontology* 2001, 89, 2–11
149. Albuschies J., Vogel V.: The role of filopodia in the recognition of nanotopographies. *Sci. Rep.* 2013, 15, 3, 1658
150. Giljean S., Ponche A., Bigerelle M., Anselme K.: Statistical approach of chemistry and topography effect on human osteoblast adhesion. *J. Biomed. Mater. Res. Part. A.* 2010, 94A, 1111–1123

Spis tabel

Tab. I.	Biomateriały o właściwościach osteoindukcyjnych wg. Barradasa	10
Tab. II.	Schemat rozcieńczeń kondycjonowanego medium	49
Tab. III.	Parametry amplitudowe, horyzontalne i hybrydowe chropowatości badanych próbek na podstawie profilometrii bezstykowej przy użyciu mikroskopu interferencyjnego NT1100	61
Tab. IV.	Skład chemiczny badanych próbek na podstawie analizy EDS podany w procentach wagi	65

11. Spis rycin

Ryc. 4.1.	Tytanowy wszczep śródkostny	31
Ryc. 4.2.	Materiał badawczy – dyski tytanowe o średnicy 8mm i grubości 1mm	32
Ryc. 4.3.	Wypreparowane łoża kostne	35
Ryc. 4.4.	Wprowadzone wszczepy	35
Ryc. 4.5.	Odsłonięte implanty	35
Ryc. 4.6.	Preparacja segmentów kostnych	35
Ryc. 4.7.	Utrwalony segment kostny	36
Ryc. 4.8.	Segment kostny zatopiony w Eponie	36
Ryc. 4.9.	Błoczki kostne krojone wzdłuż długiej osi implantu	37
Ryc. 4.10.	Preparat zeszlifowany do grubości ~30 μm	37
Ryc. 4.11.	Probówka zawierająca zamrożone ludzkie osteoblasty	40
Ryc. 4.12.	Butelka hodowlana NUNCLONE 25cm ²	41
Ryc. 4.13.	24 dołkowe naczynie hodowlane #144530 (Roskilde, Dania)	42
Ryc. 4.14.	96 dołkowa płytkę ELISA przygotowana do analizy spektrofotometrycznej zawartości białka	45
Ryc. 5.1	Obraz z mikroskopii świetlnej przekroju preparatu implant kość. Powiększenie 40x	52
Ryc. 5.2	Obraz z mikroskopii świetlnej przekroju preparatu implant kość. Powiększenie 100x	53
Ryc. 5.3	Obraz z mikroskopii świetlnej przekroju preparatu implant kość wybarwionego fioletem toluidyny. Powiększenie 200x	54
Ryc. 5.4.	Obraz z mikroskopii świetlnej przekroju preparatu implant kość. Powiększenie 400x	54
Ryc. 5.5.	Obraz z mikroskopii świetlnej przekroju preparatu implant kość wybarwionego fioletem toluidyny. Powiększenie 400x	55
Ryc. 5.6.	Obraz SEM powierzchni próbki maszynowej Powiększenie 3000x (po lewej) i 6000x (po prawej)	56
Ryc. 5.7.	Obraz SEM powierzchni próbki Al ₂ O ₃ Powiększenie 3000x (po lewej) i 6000x (po prawej)	56

Ryc. 5.8. Obraz SEM powierzchni próbki Al ₂ O ₃ DE Powiększenie 3000x (po lewej) i 6000x (po prawej)	57
Ryc. 5.9. Obraz SEM powierzchni próbki HA Powiększenie 3000x (po lewej) i 6000x (po prawej)	57
Ryc. 5.10. Obraz SEM powierzchni próbki HA DE Powiększenie 3000x (po lewej) i 6000x (po prawej)	58
Ryc. 5.11. Obraz SEM powierzchni próbki HAS Powiększenie 3000x (po lewej) i 6000x (po prawej)	58
Ryc. 5.12. Obraz SEM powierzchni próbki HAS DE Powiększenie 3000x (po lewej) i 6000x (po prawej)	59
Ryc. 5.13. Obraz izometryczny powierzchni próbki MA	62
Ryc. 5.14. Obraz izometryczny powierzchni próbki Al ₂ O ₃	63
Ryc. 5.15. Obraz izometryczny powierzchni próbki Al ₂ O ₃ DE	63
Ryc. 5.16. Obraz izometryczny powierzchni próbki HA	63
Ryc. 5.17. Obraz izometryczny powierzchni próbki HA DE	63
Ryc. 5.18. Obraz izometryczny powierzchni próbki HA	64
Ryc. 5.19. Obraz izometryczny powierzchni próbki HAS DE	64
Ryc. 5.20. Wykres zmian względnej żywotności komórek (RCV%) na badanych materiałach w czasie, w odniesieniu do materiału kontrolnego Thermanox	67
Ryc. 5.21. Stężenie białka w µg/ml w 14 dniu hodowli	69
Ryc. 5.22. Wartość aktywności fosfatazy alkalicznej wyrażona jako absorbancja przy długości fali λ=405nm	70
Ryc. 5.23. Stężenie PGE ₂ wyrażone w pg/ml w 14 dniu hodowli	71
Ryc. 5.24. Wartości względnego wskaźnika żywotności komórek (RCV%) dla pięciu rozcieńczeń kondycjonowanego medium dla każdego rodzaju insertu	72
Ryc. 5.25. Osteoblasty na powierzchni próbki HAS po jednej dobie hodowli. Powiększenie 150x	74
Ryc. 5.26. Osteoblast na powierzchni próbki Al ₂ O ₃ DE po jednej dobie hodowli. Powiększenie 5000x	74
Ryc. 5.27. Osteoblast na powierzchni HAS DE po jednej dobie hodowli. Powiększenie 5000x	75

Ryc. 5.28. Powierzchnia próbki MA po jednej dobie hodowli Powiększenie 5000x	76
Ryc. 5.29. Powierzchnia próbki maszynowej po jednej dobie hodowli. Powiększenie 150x	76
Ryc. 5.30. Powierzchnia próbki HAS DE po trzech dobach hodowli. Powiększenie 150x	77
Ryc. 5.31. Powierzchnia próbki Al ₂ O ₃ DE po trzech dobach hodowli. Powiększenie 2500x	77
Ryc. 5.32. Powierzchnia próbki MA po trzech dobach hodowli. Powiększenie 150x	78
Ryc. 5.33. Powierzchnia próbki HAS po siedmiu dobach hodowli. Powiększenie 2500x	79
Ryc. 5.34. Powierzchnia próbki HA po siedmiu dobach hodowli. Powiększenie 5000x	79
Ryc. 5.35. Powierzchnia próbki HAS po siedmiu dobach hodowli. Powiększenie 5000x	80
Ryc. 5.36. Powierzchnia próbki HAS po siedmiu dobach hodowli. Powiększenie 150x	80
Ryc. 5.37. Powierzchnia próbki MA po siedmiu dobach hodowli. Powiększenie 150x	81
Ryc. 5.38. Powierzchnia próbki HAS po siedmiu dobach hodowli. Powiększenie 1000x	81
Ryc. 5.39. Próbka HA po czternastu dniach hodowli. Powiększenie 2500x	82
Ryc. 5.40. Powierzchnia próbki Al ₂ O ₃ po czternastu dobach hodowli. Powiększenie 150x	82
Ryc. 5.41. Powierzchnia próbki MA po czternastu dniach hodowli. Powiększenie 2500x	83
Ryc. 5.42. Powierzchnia próbki MA po czternastu dniach hodowli. Powiększenie 150x	83