



Maria Angeles Perez^{1,2,3}



Manuel Doblare^{1,2,3}

Osteoindukcja in vitro ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych na powierzchni biomimetycznie modyfikowanych stopach tytanu.

In vitro osteoinduction of human mesenchymal stem cells in biomimetic surface modified titanium alloy implants

Sonia Santander,^{1,2,3} Clara Alcaine,^{1,2,3} Jaber Lyahyai,^{3,4} Maria Angeles Perez,^{1,2,3} Clementina Rodellar,^{3,4} Manuel Doblare,^{1,2,3} Ignacio Ochoa,^{1,2,3}

¹Biomedical Research Networking Center in Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine (CIBER-BBN)
² Group of Structural Mechanics and Materials Modeling (GEMM), Aragón Institute of Engineering Research, University of Zaragoza, Spain

³ Carlos III Health Institute (ISCIII), Aragón Institute of Health Sciences, Spain

⁴ Lagenbio-Ingen, Aragón Institute of Engineering Research, University of Zaragoza, Spain

kontakt z autorem:
Ignacio Ochoa;
E-mail: iochgar@unizar.es

Słowa kluczowe:
osteindukcja, powierzchnia biomimetyczna, implant tytanowy, ludzkie mezenchymalne komórki macierzyste,

Key words:
Osteoinduction, Biomimetic Surface, Titanium Implants, Human mesenchymal stem cells. Combined-surface treatment

INFORMACJA WPROWADZAJĄCA:

Implanty tytanowe są szeroko używane w ortopedii i stomatologii z powodu ich dobrej bioprzyswajalności, wytrzymałości na korozję i właściwości mechanicznych [1,2]. Jednym z ważniejszych aspektów implantu są jego cechy mechaniczne i biologiczne, powodujące dobre oddziaływanie z kością. Stabilne i wystarczająco mocne i odporne połączenie pomiędzy powierzchnią biomateriału i otaczającą go tkanką jest warunkiem koniecznym zarówno dla implantów obciążanych natychmiastowo jak i ich długoterminowego powodzenia. To zjawisko zostało w literaturze [3-6] bardzo szeroko zanalizowane. Połączenie osiąga się przez biologiczny proces (częściowo regulowany przez mechaniczne i materiałne właściwości), zwany inaczej osteointegracją implantu, który się otrzymuje przez bliskie połączenie implantu z kością za pomocą odpowiedniego i wystarczającego wzrostu nowej kości na powierzchni implantu [7]. Osiągnięcie dobrej osteointegracji zależy od czynników fizjologicznych takich jak: ilość kości i jej jakość, szczególne właściwości materiału, z którego jest wykonany implant, jego biokompatybilność, materiałowe właściwości jego powierzchni [8,9].

W literaturze zostały opisane różne modyfikacje powierzch-

Streszczenie

Wzajemne oddziaływanie komórek między komórkami, a powierzchnią implantu jest decydujące dla powodzenia klinicznego. To oddziaływanie i towarzyszące mu modyfikowane powierzchnie są niezbędne do osiągnięcia szybkiego procesu osteointegracji. Wcześniej badania modyfikacji powierzchni zarówno chemiczne jak i topograficzne zostały już opisane w literaturze.

Topografia powierzchni Biomimetic Advanced Surface (BAS) jest połączeniem metody piaskowania z anodacją. Makroszorstkość i mikroporowatość tlenku tytanu oraz jonów wapniowo-fosforowych wpływają na ich zdolności do osadzenia się. Ludzkie mezenchymalne komórki macierzyste (hMSCs), które odpowiedziały w warunkach in vitro na zastosowane działanie rozwinęło się i zostało ocenione. Otrzymane rezultaty pokazują ulepszoną możliwość przylegania i zwiększony wskaźnik proliferacji, kiedy hMSCs są hodowane na powierzchniach obrabianych. Ta modyfikacja biomimetyczna powierzchni stopów tytanu zaindukowała i wzmogła ekspresję markerów różnicowania osteoblastycznego (RUNX2 i Osteopontin) pomimo braku zewnętrznych czynników powodujących różnicowanie. Główne wnioski, jakie wynikają z naszych badań, prowadzą do stwierdzenia, że modyfikacja naszej biomimetycznej powierzchni prowadzi do znaczącego ulepszenia w osteoindukcji implantów tytanowych.

Abstract

Interaction between cells and implant surface is crucial for clinical success. This interaction and the associated surface treatment are essential for achieving a fast osseointegration process. Several studies of different topographical or chemical surface modifications have been proposed previously in literature. The Biomimetic Advanced Surface (BAS) topography is a combination of a shot blasting and anodizing procedure. Macroroughness, microporosity of titanium oxide and Calcium/Phosphate ion deposition is obtained. Human mesenchymal stem cells (hMSCs) response in vitro to this treatment has been evaluated. The results obtained show an improved adhesion capacity and a higher proliferation rate when hMSCs are cultured on treated surfaces. This biomimetic modification of the titanium surface induces the expression of osteoblastic differentiation markers (RUNX2 and Osteopontin) in the absence of any externally provided differentiation factor. As a main conclusion, our biomimetic surface modification could lead to a substantial improvement in osteoinduction in titanium alloy implants.

ni implantów, które znacząco zwiększają ich osteointegrację. Jednym z najczęściej używanych procesów jest wprowadzanie różnych chemicznych lub/i biochemicznych materiałów na ich powierzchnię. Takie zmiany składu atomowego doprowadziły do wyraźnych ulepszeń w reakcji komórek na powierzchni materiału zarówno *In vitro* jak i *In vivo* [10-13].

Impregnacja lub pokrycie hydroksyapatytem, [14-15] lub fosforem wapnia [16-17] zostało zaproponowane ze względu na podobieństwo biomimetyczne. Jakkolwiek mimo sukcesu osiągniętego poprzez chemiczne modyfikacje powierzchni we wczesnej integracji wszczepionego implantu, powszechna jest ogólna zgoda, że modelowanie powierzchni jest ważnym i pożądanym czynnikiem bez względu na chemiczne podobieństwo implantów kostnych [18-19]. Korzyści z modyfikacji powierzchni topograficznej zostały wcześniej opisane *in vitro* i *in vivo* [20-23]. Badania *in vitro* pokazały, że topografia powierzchni ma wpływ na liczne funkcje komórkowe takie jak: przyczepianie się komórek, podział komórkowy, rozróżnicowanie komórek i miejscowy czynnik produkcji [24]. Również wspomaga oddziaływanie implant-komórka lub powierzchnia implantu-kość [25-27]. Dla przykładu, biokompatybilność implantu zależy od szczególnego oddziaływania implantu (jego powierzchni) na komórki. W szczególności osteoblasty łatwiej się przyjmują na szorstkich powierzchniach [28,29]. Także podział komórkowy na szorstkich powierzchniach zależy od parametrów takich jak morfologia komórkowa, produkcja macierzy pozakomórkowej, różna aktywność zasadowości fosfatów i produkcja osteokalcyny [29]. Oddziaływanie pomiędzy komórkami i macierzą pozakomórkową (ECM) jest innym ważnym czynnikiem regulującym funkcje komórkowe takie jak: kształt, łańcuch, podział i ich przeżycie.

Jednak mimo tak ważnego zjawiska, jakim jest reakcja komórek z powierzchnią implantu, żeby osiągnąć szybszą formację kostną i lepsze rezultaty kliniczne, istnieje niewiele badań o molekularnych mechanizmach odpowiedzialnych za chemicznie uzależnioną adhezję białkową i jej mechaniczne zmienne takie jak porowatość, topografia powierzchniowa, tarcie, sztywność i siła [30-32].

Użycie ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych (hMSCs), przyczyniające się do szybkiej osteointegracji implantów, jest uważane za ważny czynnik ich integracji w celu ulepszenia rekonstrukcji funkcjonalnych kości [27]. Dzięki ich strategicznemu położeniu, MSCs zostały opisane jako jeden z najważniejszych czynników w leczeniu złamań kostnych i we wszczepieniu implantu, nawet ważniejsze od wcześniej istniejących osteoblastów. Wszczepienie implantu wywołuje uzupełnienie MSCs uszkodzonego miejsca, będąc głównymi komórkami odpowiedzialnymi za gojenie się kości i jej kształtowanie po właściwych komórkach osteoprogennych [33]. Jest wiadome, że komórki macierzyste ze szpiku kostnego mają zdolność do dzielenia się na różne typy komórek wliczając pochodzenie osteogenne [34], dlatego też, obecne badania zostały zaprojektowane, żeby ocenić reakcję komórkową *in vitro*, komórek MSCs (komórek BMH) pobranych ze szpiku kostnego na biomimetycznie modyfikowanych powierzchniach tytanowych. Głównym celem tego badania jest porównanie przyczepności, proliferacji, rozróżnicowania się hodowliosteoblastów hMSCs, które zanalizowano w systemie *in vitro*, oferując aplikację modelu *in vivo*

MATERIAŁY I METODOLOGIA

Producent dysków tytanowych

Zostały użyte dyski Tytanu V stopnia ELI Ti (Ti6Al4V) dostarczone przez Avinent Implant System (Barcelona, Hiszpania). Obrobione i polerowane dyski o średnicy 10 mm i grubości 2 mm podzielono na dwie grupy: nieobrobione polerowane i dyski obrobione powierzchnią BAS (Biomimetic Advanced Surface). Obróbka powierzchni BAS została otrzymana w wyniku połączenia dwóch procesów. Pierwszy to piaskowanie przy użyciu tlenku glinu ze średnicą ziarna od 212 do 300 μm w czasie 30-40 s pod ciśnieniem 3-5 bar. Następnie dyski były anodowane przez 40-90 s poprzez podłączenie ich do prądu stałego przy użyciu roztworu elektrolitowego bogatego w wapń i fosfor w stosunku 2/1 Ca i P. Topografię powierzchni BAS charakteryzuje makroszorstkość i mikroporowatość w tlenku tytanu wzbogaconego o wapń i fosfor. Nieobrobione dyski były przygotowane poprzez początkowe polerowanie ich papierem z węglikiem krzemu i później tlenkiem glinu o rozmiarze cząsteczki 1 μm i 0,05 μm . Tytanowe dyski umyto w ultradźwiękowej kąpeli, żeby usunąć pozostałości po cząsteczkach tlenku glinu. Następnie wysterylizowano je w autoklawie i poddano hodowli komórek. Normalna plastikowa powierzchnia kultury została użyta do kontroli.

Charakterystyka dysków tytanowych

Topografię próbek i ich szorstkość mierzono za pomocą mikroskopu interferencyjnego w świetle białym (NewView 7100, ZygoLot, Darmstadt, Germany). Dwa różne typy soczewek (x10, x50) zostały użyte do zbadania powierzchni próbek. Mikroporowatość została zbadana mikroskopem elektronowym (Inspect F. FEI, Hillsboro, Oregon, USA) pod napięciem przyspieszającym 20 kV. Chemiczne cechy zbadano Rentgenowską spektrometrią fotoelektronów (XPS) (AXIS Ultra DLD, KRATOS, UK) opisaną przez Boyda [35].

Hodowla komórkowa

hMSC z ludzkiego szpiku kostnego (Lonza, Bazylea, Szwajcaria) zostały utrzymane w Ralpha-ModifiedEagle's Medium (Sigma, Steinheim, Germany) dopełnione 10% (v/v) bydlęcą surowicą płodową, 100 U/mL penicyliny and 100 mg/ml streptomycyny (Sigma) i 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ FGF-2 (SIGMA) w 37 °C. Komórki były kultywowane z wykorzystaniem Trypsyn-EDTA (Sigma) i posiane kontrolnie na obrobionych i nieobrobionych próbkach po 24 sztuki z każdej, w celu zbadania ich rozróżnicowania, proliferacji i adhezji. Środki zmieniano dwa razy w tygodniu. Do wszystkich badań użyto roztwór 10% FBS bez innych czynników. Wszystkie badania były prowadzone z użyciem komórek aż do 5 cyklu.

Obserwacja morfologii komórkowej

Próbne powierzchnie zbadano za pomocą mikroskopu elektronowego po posiewie komórek (Inspect F. FEI). Po pierwszym dniu hodowli dyski z kultywacją umieszczono w 2% aldehydzie glutarowym. Tytanowe dyski umyto w buforze fosforanowym (PBS). Próbki zostały odwodnione poprzez wzrastające serie etanolowe i wysuszone do krytycznego momentu, pokryte złotem (10-15nm) i zaobserwowane pod elektronową mikroskopią skaningową (SEM).

Analiza adhezji komórkowej

Przyczepność komórkowa na każdym podłożu była oceniana poprzez zarejestrowanie numeru komórek przyczepionych po inkubacji: 2×10^5 komórek/próbka było wszczepionych na mate-

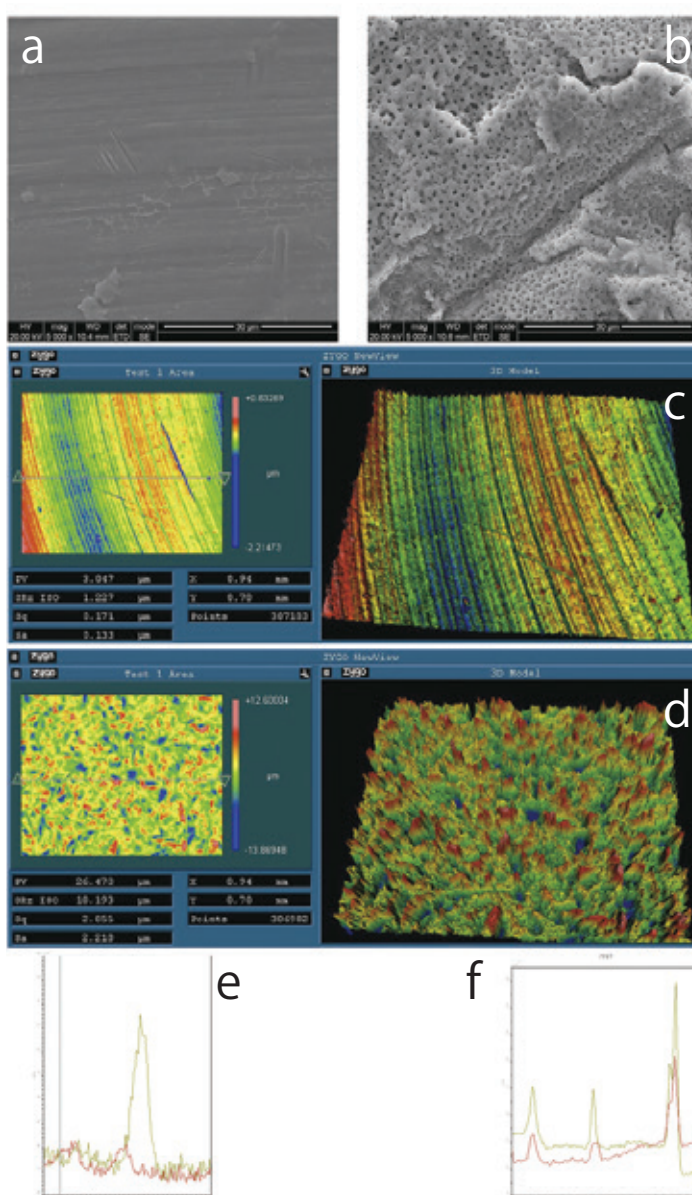
riałach i inkubowanych przez 6, 12 i 24 godziny. Próbkki zostały umyte buforem fosforanowym (PBS) w celu eliminacji nieprzyczepionych komórek. Przyczepione komórki zdjęto przez podwójną inkubację za pomocą trypsyny 0.25% w EDTA (Sigma). Pozostałe komórki policzono w komorze Neubauera (zwanej również Hemocytometrem). Do badań wzięto trzy pomiary z każdej grupy. Rezultaty wyrażono jako liczbę całkowitą komórek przyczepionych do dysku.

Analiza podziału komórkowego

Rezultat podziału komórek hMSCs hodowanych na dyskach oceniono mierząc ilość komórek obecnych na materiale po 7, 14 i 28 dniach hodowli. Poprzednio używane stężenie komórek spowodowało zahamowanie styczości z powodu braku przestrzeni po 28 dniach hodowli (dane niewykazane). Optymalne zagęszczenie wynoszące 50 000 komórek na dysk używano w długim czasie kultywacji. Po skończeniu tego okresu komórki odłączono za pomocą tryptynizacji i policzono w komorze Neubauera. Do badań wzięto trzy pomiary z każdej grupy.

Ekspresja genu w czasie rzeczywistym w Reakcji łańcuchowej polimerazy RT-PCR / PCR z odwrotną transkryptazą PCR z odwrotną transkryptazą użyto do oszacowania poziomu ekspresji genu kilku znanych osteogennych markerów w komórkach hMSCs. Komórki

hMSCs były hodowane na dyskach tytanowych (5×10^5 5 komórek/mL) podczas 7, 14, 21 i 28 dni. Plastikowa powierzchnia kultury została użyta do kontroli. W tych przedziałach czasowych komórki zostały odtryptyzowane dwa razy i RNA został wyizolowany za pomocą odczynnika Trizol (Invitrogen, Life Technologies Ltd, Paisley, UK). Pierwsza łańcuchowa synteza jedno-łańcuchowego cDNA z RNA do użycia szablonu PCR została wykonana za pomocą SuperScript™ First-Strand cDNA Synthesis Kit (Invitrogen). Ekspresję genów powiązanych osteogennie zawierającą transkrypcję faktoru-2 (RUNX-2) i Osteopontin (OPN) zwalidowano poprzez reakcję łańcuchową polimerazy w czasie rzeczywistym (Applied Biosys-



Ryc. 1 Charakterystyka dysków tytanowych: Zdjęcie SEM (5000x) nieobrabiany (a) i obrabiany (b); szorstkość 3D mierzona optycznie (x10) pod interferencyjnym mikroskopem w białym świetle. Model 3D i parametry szorstkości na nieobrabianych dyskach (c) i biomimetycznie obrabiana powierzchnia (d); Analiza chemiczna tytanowych dysków. Obrabione próbki reprezentuje kolor zielony, a kontrolne próbki czerwony. Konkretne obszary wapnia (e) i fosforu (f) są pokazane.

Fig. 1 Titanium disc characterization: SEM images (5000x) of non-treated (a) and treated discs (b); 3D roughness measured optically (x 10) with a white light interference microscope. The 3D model and the roughness parameters of the untreated samples (c) and the biomimetic treated surface (d); Chemical analysis of the titanium discs. Treated samples are represented in green and control samples represented in red. The specific areas of calcium (e) and phosphorus (f) are shown.

tem, Real time-PCR detection system). Analiza polimerazy TaqMan na żądanie ekspresji analizy (GAPDH Nr próby: Hs00266705_g1; OPN: SPP1 Nr próby: Hs00959010_m1; RUNX-2: RPL32 Nr próby: Hs00851655_g1). Wszystkie próbki były analizowane w trzech egzemplarzach. Porównawczy cykl wartości progowej został użyty do obliczenia względem jakości RUNX-2, OPN i GAPDH. Względny poziom ekspresji każdego badanego genu znormalizowano za pomocą genu opiekuńczego GAPDH i za pomocą ekspresji genów badanych w kontrolnych próbkach.

Analiza statystyczna Wszystkie badania wykonano trzykrotnie. Jednokierunkowy test wariancji ANOVA wraz z testem t-studenta służył do określenia różnic w każdej grupie (oprogramowanie SPSS). Graniczny poziom istotności p-wartość $p < 0.05$.

WYNIKI

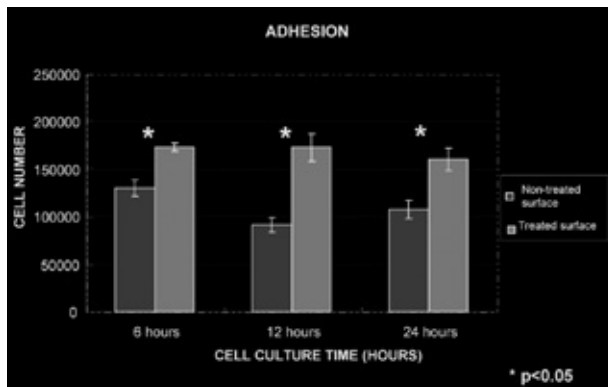
Charakterystyka powierzchni

Optyczne pomiary szorstkości i zdjęcia elektronowej mikroskopii skaningowej różnych powierzchni pokazują, że powierzchnia BAS posiada makro- i mikroskopową szorstkość dzięki działaniu cząstek tlenku glinu podczas procesu piaskowania. Zagłębienia o średnicy 1-2 μm są jednolicie rozmieszczone na całej powierzchni (Ryc. 1a i b). Obrabione i nieobrobione próbki

pokazały średnią wartość chropowatości powierzchni odpowiednio $0.276 \mu\text{m} \pm 0.08$ i $2.8 \mu\text{m} \pm 0.36$. Znaczące różnice ($p < 0.05$) w szorstkości 3D zaobserwowano w obydwu próbkach (Ryc. 1c i d). Analiza chemiczna pokazała obecność tlenu, wapnia, fosforu i sodu na próbkach obrabianych powierzchni. Pierwiastki te wprowadzono na powierzchnię podczas procesu anodacji (Ryc. 1e i f).

Adhezja komórkowa

Efekty na obrabianych i nieobrabianych powierzchniach tytanowych dysków i zwiększenie ich przyczepności w hMSCs zostały ocenione poprzez liczenie komórkowe. Koncentracja komórkowa w ilości 200 000 komórek/dysk była przetestowana. Wyniki poka-



Ryc. 2 Wykresy pokazują przyczepność komórek mierzona w początkowej koncentracji komórek 200.000 komórek na dysku. Został użyty normalny plastikowy podkład do hodowli komórek. Dane przedstawiono za pomocą błędów standardowych z przynajmniej trzema niezależnymi próbami. Różnice zanalizowano za pomocą jednokierunkowego testu ANOVA, przyjmując poziom istotności 95%.

Fig. 2 The graphs show cell adhesion measured with an initial cell concentration of 200,000 cells/disc. A normal plastic culture surface was used as control (data not shown). Data are presented as mean \pm S. E. of at least three independent experiments. Differences were analysed by one-way analysis of variance, with $p < 0.05$ being considered statistically significant (*).

zały (Ryc. 2) znaczący wzrost przyczepności komórkowej na obrabianych dyskach w porównaniu z nieobrobionymi ($n=9$; $p<0.05$ na 6, 12 i 24 godziny). Zaobserwowano lekki spadek przyczepności komórek na nieobrobionych dyskach. Minimum osiągnięto po 12 godzinach po posiewie komórkowym. Jednak większa i znacznie liczniejsza ilość komórek była wykrywana na obrabianych próbkach. Zdjęcia podłoża, zrobione elektronową mikroskopią skaningową po 24 godzinach od posiewu, pokazują lepszą przyczepność komórek na obrabianych dyskach. Można to zauważyć na Ryc. 3, gdzie widoczna jest cienka warstwa komórek na nieobrobionych powierzchniach i komórki rozprzestrzeniające się na różnych warstwach i całkowicie pokrywające powierzchnie obrabiane.

Prolifercja komórkowa

Po 28 dniach zauważamy widoczny wzrost komórek w porównaniu do nieobrobionych próbek. Jednak nieznaczny spadek liczby komórek zaobserwowano po 14 dniach w obydwu grupach w porównaniu z poprzednimi grupami czasowymi. Prolifercja na powierzchni BAS w obrabianych prób-

kach w porównaniu do nieobrobionych w dniu 7 i 28, a znaczący wzrost w dniu 14 i 21 (Ryc. 4)

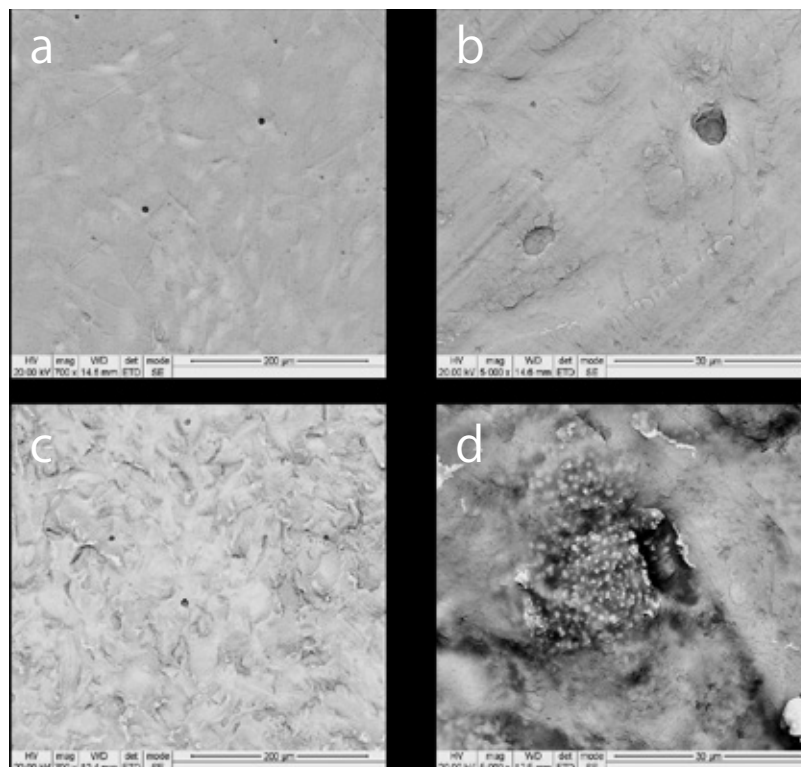
ROZRÓŻNICOWANIE KOMÓRKOWE

Komórki rosnące na plastikowej powierzchni do ich kultury były użyte jako kontrola do normalizacji wyników otrzymanych w badaniu RT-PCR, jak również do oceny osteogennego efektu tytanu. Ekspresja Osteopontyny i Runx-2 w hMSCs została oddzielona od różnych powierzchni i zanalizowana. Obydwie tytanowe powierzchnie były w stanie zwiększyć ekspresję osteogennych różnicujących markerów. Jednak próbki z powierzchnią BAS podniosły poziom ekspresji osteopontyny (Ryc. 5a) i Runx-2 (Ryc. 5b) w porównaniu z nieobrobioną powierzchnią. Te różnice były znaczące w dniu 14 dla OPN i w dniu 7 dla Runx-2. W dniu 28 obydwie geny pokazały znaczące różnice w porównaniu do nieobrobionych próbek.

DYSKUSJA

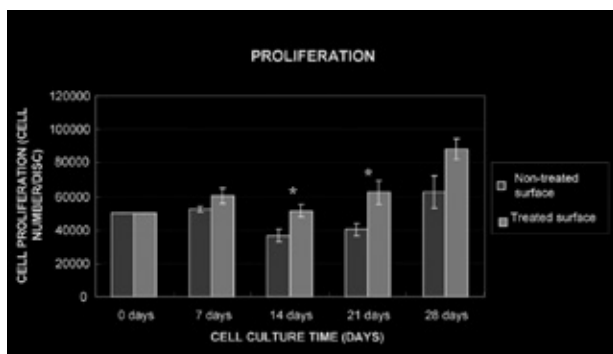
Wykazano, że wstępny warunkami na udaną i szybkoosteointegrację oraz długoterminową stabilność jest szybka osteointegracja. W obydwu przypadkach powierzchnia implantu jest najwyższej wagi. Właściwości powierzchni biomateriałów odgrywają kluczową rolę w osiągnięciu oddziaływania komórka-biomateriał [28]. Wyniki przedstawione w tym badaniu pokazują, że powierzchnie zmodyfikowane biomimetycznie posiadają korzystny efekt w procesie osteoindukcji w badaniach In vitro. Te pozytywne

wyniki zaobserwowano w zachowaniu się mezenchymalnych komórek, dzięki połączeniu czynników takich jak topografia, mikrostruktury i powierzchnia chemiczna. Wielokrotnie wykazano, że szorstkość powierzchni ma olbrzymi wpływ na adhezję osteoblastów, ich proliferację i różnicowanie [21, 32, 36-38]. Większość badań porównujących wpływ modyfikacji powierzchni tytanowych implantów określa zmianę w ich adhezji, proliferacji i różnicowaniu komórki osteoblastów. Jakkolwiek w tym badaniu zdecydowano się użyć ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych ze



Ryc. 3 Zdjęcia SEM komórek na nieobrobionych (a, b) i obrabianych (c, d) na różnych powiększeniach po 24 godzinach w hodowli. Zdjęcia kontrolne o powiększeniu 700x (a) i biomimetycznie obrabiane próbki (c); zdjęcia o powiększeniu 5000x na nieobrobionych (b) i obrabianych próbkach (d).

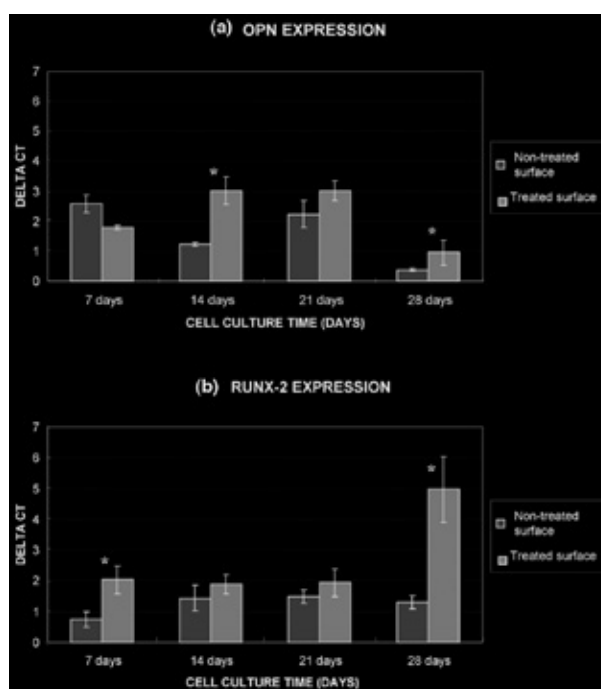
Fig. 3 SEM images of cells on non-treated (a, b) and treated (c, d) titanium surface at different magnifications after 24 h in culture. Pictures at 700X magnification of the control (a) and the biomimetic treated samples(c); Pictures at 5000X magnification of non-treated and treated samples, respectively (b) and (d).



Ryc. 4 Proliferacja komórkowa na dyskach z początkową koncentracją komórkową 50.000 komórek/dysk podczas 28 dni. Normalna plastikowa powierzchnia kultury (dane niewykazane). Dane przedstawiono jako Błąd Standardowy z co najmniej trzema niezależnymi próbami. Różnice zanalizowano za pomocą jednokierunkowego testu ANOVA przyjmując Graniczny poziom istotności p-wartość $p < 0.05$

Fig. 4 Cell proliferation on the discs with an initial cellular concentration of 50,000 cells/disc during 28 days. A normal plastic culture surface was used as control (data not shown). Data are presented as mean \pm S.E. of at least three independent experiments. Differences were analyzed by one-way analysis of variance, with $p < 0.05$ being considered statistically significant (*).

względu na ich bliskość fizjologicznych warunków i odgrywającą kluczową rolę w fizjologicznym procesie osteointegracji. Mezenchymalne komórki macierzyste są niezróżnicowanymi pluripotentnymi komórkami obecnymi w szpiku kostnym, czyli mogą się różnicować w więcej niż jeden typ komórek. Na przykład mogą się różnicować lub specjalizować w komórki chrząstki (chondrocyty), komórki kości (osteoblasty) oraz komórki tłuszczowe (adypocyty) i mogą być odpowiednim źródłem autogennych komórek dla regeneracji tkanki. Razem z komórkami pochodzącymi z krwi MSC są komórkami odpowiedzialnymi za pierwszy kontakt z powierzchnią tytanowych implantów [39-41]. Przyczepność tych komórek do powierzchni biomateriału może być ważniejszym czynnikiem dzięki jego biokompatybilności. Wysoki stopień przyczepności komórek do powierzchni pozwala na większą przyczepność otaczających tkanek do biomateriału. W naszym badaniu zaobserwowaliśmy, że hMSCs były w stanie nie tylko przyczepić się o wiele bardziej na dysku o zmienionej powierzchni jak również w dużym stopniu zwiększyć ich liczbę w porównaniu do dysku nieobrobionego. Takie polepszenie przyczepności komórkowej w zgodzie z innymi autorami [42, 43] mogłoby być wytłumaczone zwiększoną zmodyfikowaną powierzchnią. Zwiększona powierzchnia kontaktu zmodyfikowanych dysków może być powiązana z większą adsorbacją pochodzącą za pośrednictwem surowicy z hodowli komórek. Adsorbacja białek i remodelacja matrycy na styczności komórek z materiałem została już wcześniej opisana jako silny induktor przyczepności komórek (44). Inne wcześniejsze prace również są w zgodzie z naszymi wynikami przyczepności i proliferacji (25, 45). Elektronowa mikroskopia skaningowa pokazała, że komórki hodowane na obrobionych powierzchniach tworzyły wielokomórkowe warstwy kompletnie pokrywające całą próbkę, podczas gdy te hodowane na nieobrobionych mnożyły się, ale nie tworzyły warstw. W naszym badaniu mogliśmy rozróżnić ekspresję osteogennych markerów (Runx-2 i osteopontin(OP)) w nieobecności żadnego innego chemicznego induktora. Runx-2 jest wczesnym osteogennym markerem i służy jako czynnik transkrypcyjny komórek kości. Już wcześniej zbadano, że Runx-2 jest niezbędny w różnicowaniu się



Ryc. 5 Analiza PCR z odwrotną transkrypcją wybranych genów wyrażonych przez hMSCs w normalnych warunkach w kulturze komórkowej na obrabianych i nieobrabianych powierzchniach. (a) Ekspresja Osteopontinu (OPN) i (b) ekspresja RUNX-2. Kontrolnie użyto normalnego podłoża plastikowego (dane nie pokazane). Wartości zostały znormalizowane dla GAPDH. Dane przedstawiono jako Błąd Standardowy z co najmniej trzema niezależnymi próbami. Różnice zanalizowano za pomocą jednokierunkowego testu ANOVA, przyjmując Graniczny poziom istotności p-wartość $p < 0.05$.

Fig. 5 Real - Time - PCR analysis of selected genes expressed by hMSCs under normal conditions in cell cultures on treated and non-treated surfaces. (a) Osteopontin expression (OPN) and (b) RUNX-2 expression. A normal plastic culture surface was used as control (data not shown). Values were normalized for GAPDH. Data are presented as mean \pm S.E. of at least three independent experiments. Differences were analysed by one-way analysis of variance, with $p < 0.05$ being considered statistically significant (*).

osteoblastów, w ekspresji genetycznej matrycy białkowej kości, formacji kostnej, rozwoju zębów i determinuje pochodzenie osteoblastów z mezenchymalnych komórek, które również odnoszą się do genów kości i zębów (46,47). Wyższą ekspresję tych genów można powiązać z wyższą mineralizacją. OP jest późnym osteogennym markerem i jego obecność wzrasta później, podczas gdy Runx-2 rośnie we wczesnym etapie różnicowania. Stwierdzono, że OP pełni nie tylko ważną rolę w matrycy zwapnienia tkanek twardych ale również w przyczepności, rozprzestrzenianiu się i migracji komórkowej (48,51). Jednak mechanizm regulujący jego czynności pozostaje niejasny (52-57). Na Ryc. 5 możemy zaobserwować, że czasowe rozmieszczenie zróżnicowanych markerów jest zgodne z opisem w literaturze (46). Wczesny wzrost Runx-2 w 7 dni jest zastępowany wyższym wskaźnikiem OP mRNA w 14 dni. Oba rozróżniające markery zostały opisane jako ważne elementy w mineralizacji matrycy (46, 47). To mógłby być powód, dlaczego obydwa markery są przekroczone w 28 dniu. Ta sekwencja molekularna została osiągnięta w naszym badaniu przy nieobecności innych środków z wyjątkiem biomimetycznie zmodyfikowanej powierzchni. Zbierając razem wszystkie wyniki In vitro można wywnioskować, że używanie implantów tytanowych o powierzchni BAS do ortopedycznych i protetycznych protez polepsza osteointegrację i osteokondukcję, stymulując prolifera-

AVINENT®

Implant System

cję mezenchymalnych komórek szpiku kostnego, ich przyczepność i podział na przeznaczenie osteoprogenne w nieobecności żadnych innych cząstek. Te rezultaty pokazują, że modyfikacja powierzchni jest ważnym parametrem modyfikującym zachowanie komórkowe, które powinno być wzięte pod uwagę przy projektowaniu kształtu implantu.

PODZIĘKOWANIA

To badanie powstało przy współpracy Instituto de Salud (Instytut Zdrowia) Carlos III (ISCIII) dzięki inicjatywie CIBER. Tytanowe dyski zostały podarowane przez AVINENT (Barcelona, Spain). Autorzy dziękują firmie Lot-Oriel za wsparcie w topograficznej charakteryzacji, jak również Gilleremu Antorrena i Carolinie Prozzi za ich wsparcie techniczne.

INTRODUCTION

Titanium implants are widely used in orthopaedics and dentistry because of their good biocompatibility, resistance to corrosion and mechanical properties^{1,2}. One essential aspect in the performance of an implant is the mechanical and biological behaviour of its interface with bone. A stable and sufficiently stiff and resistant interface between the biomaterial surface and the surrounding tissue is a vital prerequisite both for immediate implant loading and for the long-term success of such implants. This phenomenon has been extensively analyzed in the literature³⁻⁶. The interface is usually achieved by the biological process (partially regulated by mechanical and material properties) known as osseointegration of the implant, which is obtaining an intimate connection of the implant within the bone by means of an appropriate and sufficient growth of new bone on the surface of the implant⁷. Achieving a good osseointegration depends on physiological variables such as bone quantity and quality, on the particular properties of the implant material, on the biocompatibility of the implant, and on the material and implant surface properties^{8,9}.

Various surface modifications of titanium implants that greatly improve the osseointegration process have been described in the literature. One of the most widely used processes is introducing different chemical and/or biochemical substances on the surface. Such modifications of the atomic composition of the surface have led to significant improvements in the cell response on the surface material both in vitro and in vivo¹⁰⁻¹³. Impregnation or coating with hydroxyapatite^{14,15} or calcium phosphate^{16,17} have been proposed as biomimetic approaches. However, despite the success achieved through surface chemistry modifications in the early host-implant integration, there is a general consensus that the modulation of surface texturing is also an important and desirable variable, regardless of the surface chemistry approach followed in endosseous implants^{18,19}. The benefits of topographical surface modifications have been previously described in vitro and in vivo²⁰⁻²³. In vitro studies have shown that surface topography affects different cellular functions such as cell adhesion, proliferation, differentiation and local factor production²⁴, but that it also favours appropriate implant-cell interactions on the bone-implant interface²⁵⁻²⁷. For example, implant biocompatibility largely depends on the particular effect of the implant (especially its surface) on cells. In particular, osteoblastic cells tend to adhere quickly on rough surfaces^{28,29}. Also, cell differentiation on rough surfaces is conditioned by parameters such as cell morphology, extracellular matrix production, the specific activity of alkaline phosphatase, and osteocalcin production²⁹. The interaction between cells and the extracellular matrix (ECM) is another critical factor for regulating cell functions such as cell shape, migration, proliferation, and survival.

However, despite the widely accepted crucial role of the initial interaction between cells and implant surface in achieving a faster initial bone formation and therefore in the final clinical success, little is known about the specific molecular mechanisms involved in the surface chemistry-dependent protein adhesion and its interaction with mechanical variables such as roughness, surface topography, friction, stiffness and strength³⁰⁻³². The use of human mesenchymal stem cells (hMSCs) in promoting rapid osseointegration of implants has been proved to be highly relevant in terms of their potential to integrate with and promote functional restoration of bone²⁷. Due to their strategic location, MSCs have been described as one of the most important players in bone fracture healing and implant incorporation, even more important than pre-existing osteoblast. Implant collocation induces MSCs recruitment into the damaged zone being those cells the main responsible cells of the bone healing and bone formation after becoming osteoprogenitor cells³³. It is also well known that bone marrow mesenchymal stem cells have the ability to differentiate into various cell types including osteogenic lineage³⁴.

Therefore, the present study was designed to evaluate the cellular response in vitro of human bone marrow derived MSCs cells (BMH cells) on biomimetic modified titanium surfaces. The main purpose of this study was to compare the adhesion, proliferation and osteoblastic differentiation potential of hMSCs culture that have been analyzed in an in vitro system that offers a tandem model to in vivo applications.

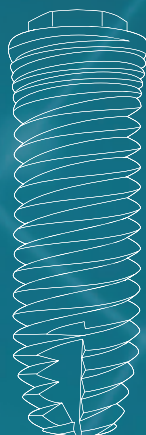
MATERIALS AND METHODS

Titanium disc fabrication

Grade 5 ELI Ti (Ti6Al4V) titanium discs supplied by Avinent Implant System (Barcelona, Spain) were used. The machined and polished discs of 10 mm diameter and 2 mm thick were divided in two groups: non-treated polished discs and discs treated with BAS (Biomimetic Advanced Surface). The BAS surface treatment was obtained by a combination of two processes. First, a shot blasting procedure was carried out using aluminium oxide as a blast media with a particle size between 212 and 300 µm for 30-40 s at 3-5 bars. Afterwards, the discs were anodized for 40-90 s by connecting them to a Direct Current power supply and using an electrolyte solution rich in Ca and P results in a ratio 2/1 of Ca and P. The BAS surface topography is characterized by the presence of macrorough-

REKLAMA

Idąc w kierunku PRZYSZŁOŚCI



AVINENT Implant System to wieloletnie doświadczenie oparte na ciągłym zaangażowaniu, doskonaleniu jakości i poszerzaniu asortymentu.

Powodzenie AVINENTU to nieustanne doskonalenie i współpraca z najlepszymi centrami badawczymi, implantologami i protetykami.

AVINENT zrewolucjonizował świat implantologii tworząc powierzchnię BIOMIMETIC ADVANCED SURFACE zainspirowaną naturą, zawierającą wapń i fosfor - 2 pierwiastki niezbędne do życia.

Informacja: 0048 882 114 563
poland@avinent.com

www.avinent.com

ness and microporosity in the titanium oxide with a calcium and phosphorus deposit. The non-treated discs were prepared through initial polishing with silicon carbide paper and then with aluminium oxide with a particle size of 1 μm and 0.05 μm . The titanium discs were washed in an ultrasound bath to remove traces of aluminum oxide particles that may remain during treatment and autoclaved before being used in cell cultures. Standard tissue culture plastic was used as control.

Titanium disc characterization

Sample topography and roughness were measured optically with a white light interference microscope (NewView 7100, ZygoLot, Darmstadt, Germany). Two different objective lenses ($\times 10$, $\times 50$) were used to characterize the sample surface. The microporosity of the samples was examined by scanning electron microscopy (Inspect F, FEI, Hillsboro, Oregon, USA) at an accelerating voltage of 20 kV. The chemical characterization was carried out with X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) (AXIS Ultra DLD, KRATOS, UK) as described by Boyd et al.³⁵.

Cell culture

hMSCs from human bone-marrow (Lonza, Basel, Switzerland) were maintained as sub-confluent monolayers in alpha-Modified Eagle's Medium (Sigma, Steinheim, Germany) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin and 100 mg/mL streptomycin (Sigma) and 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ FGF-2 (SIGMA) at 37°C. The cells were harvested using trypsin-EDTA (Sigma) and seeded on control, treated and non-treated samples in 24-well plates for differentiation, proliferation and adhesion tests. The medium was changed twice a week. For all the experiments, 10% FBS normal medium was used without any differentiation factors. All the experiments were conducted using cells up to passage 5.

Cell morphology observation

The sample surfaces were also examined by scanning electron microscopy after cell seeding (Inspect F, FEI). After 1 day in culture, the seeded discs were fixed with 2% glutaraldehyde. Following fixing, the titanium discs were washed in phosphate buffered saline (PBS). The samples were then dehydrated through the ascending ethanol series, dried to critical point, gold coated (10–15 nm) and viewed through a scanning electron microscope (SEM) as previously described.

Cell adhesion assay

Cell attachment on each substrate was evaluated by recording the number of cells attached after incubation: 2 \times 10⁵ cells/sample were seeded on the materials and incubated for 6, 12 and 24 h. The specimens were then washed with PBS to eliminate unattached cells. The adherent cells were removed from the substrate by incubation twice with trypsin 0.25% in EDTA (Sigma). The resulting cell suspension was counted with a Neubauer chamber. Three measurements on each group were performed per experiment. The results were expressed as the number of total adherent cells per disc.

Proliferation assay

The proliferation of hMSCs cells cultured on the discs was evaluated by measuring the cell number present on the material after 7, 14, 21 and 28 days of culture. The previously used cell concentration induced contact inhibition due to lack of space after 28 days in culture (data not shown). An optimal concentration of 50,000 cells per disc was used for long culture periods. Once the culture period was over, the cells were detached by trypsinization and counted with a Neubauer chamber. Three measurements on each group were performed per experiment.

Gene expression by real time–polymerase chain reaction Semi-quantitative RT-PCR was used to assess the gene expression level of several well known osteogenic markers in hMSCs cells. The hMSCs cells were cultured on titanium discs (5 \times 10⁵ cells/mL) over a time period of 7, 14, 21 and 28 days. Plastic tissue culture was used as control. At these times intervals, the cells were trypsinised twice and RNA extracted using a Trizol reagent (Invitrogen, Life Technologies Ltd, Paisley, UK). The first-strand synthesis of single-strand cDNA from RNA for use as a PCR template was carried out with a SuperScriptTM First-Strand cDNA Synthesis Kit (Invitrogen). Expression of osteogenesis-related genes including runt-related transcription factor-2 (RUNX-2) and Osteopontin (OPN) were quantified using Real time-PCR (Applied Biosystem, Real time-PCR detection system) TaqMan Assay on demand expression Assays (GAPDH Assay ID: Hs00266705_g1; OPN: SPP1 Assay ID: Hs00959010_m1; RUNX-2: RPL32 Assay ID: Hs00851655_g1). All the samples were analyzed in triplicate. The comparative cycle threshold-value method was used to calculate the relative quality of RUNX-2, OPN, and GAPDH. The relative expression levels for each gene of interest were normalized with the expression of the housekeeping gene GAPDH and with the expression of the genes of interest in the control sample.

Statistical analyses

All cell culture experiments were carried out in triplicate at least three times. Analysis of variance (ANOVA) and pairwise multiple comparison tests (t student test) were used to determine differences within each group (SPSS software package). A statistical significance was obtained for $p < 0.05$.

RESULTS

Surface characterization

The optical roughness measurements and the scanning electron microscopy pictures of the different surfaces show that the BAS surface samples have macro and microscopic roughness due to the impact of aluminium oxide particles during the shot blasting process, and pores with a diameter of 1–2 μm uniformly distributed throughout the surface (Figs. 1a and b). Polished and treated samples showed a Ra mean value of 0.276 $\mu\text{m} \pm 0.08 \mu\text{m}$ and 2.8 $\mu\text{m} \pm 0.36 \mu\text{m}$ respectively. Significant differences ($p < 0.05$) in 3D roughness were observed between both samples (Figs. 1c and d). Chemical analysis showed the presence of oxygen, calcium, phosphorous and sodium on the surface of the treated samples, elements introduced on the surface during the anodization process (Figs. 1e and f). Cell adhesion

The effects of treated and non-treated superficial Ti discs on enhancing human MSC adhesion were evaluated by cellular counting. A cellular concentration of 200,000 cells/disc was tested. The results showed (Fig. 2) a significant increase in the cellular adhesion on the treated surface during 24 h when compared to the non-treated one ($n=9$; * $p < 0.05$ for 6, 12 and 24 h). A clear decrease in the attached cells to the non-treated titania

discs was observed. The minimum was achieved 12 h after cell seeding. However, an almost constant and significantly higher number of cells were detected in the treated samples. Scanning electron micrographs of the cells on the substrates after 24 h of seeding showed a better adherence of the cells on the treated titanium surface than on the non-treated surface. This can be observed in Fig. 3 which shows a thin layer of cells appearing on the non-treated surface and cells spreading in different layers completely covering the treated surface of the discs.

Cell proliferation

Over 28 days, the treated surface samples showed an increased number of cells when compared to the non-treated samples. However, a non-significant decrease in cell numbers was observed after 14 days in both groups in comparison with previous time points. Proliferation on the BAS treated surfaces was observed when compared to the non-treated surfaces on day 7 and 28, this increase being significant on day 14 and 21 (Fig. 4).

Cell differentiation

Cells growing on common plastic culture surfaces were used as a control to normalize the results obtained in the RT-PCR analysis to also evaluate the osteogenic effect of the titanium. The expression of Osteopontin and Runx-2 in hMSCs isolated from the different surfaces was analyzed. Both titanium surfaces were able to increase the expression of the osteogenic differentiation markers. However, the BAS surface samples were able to enhance the expression levels of osteopontin (Fig. 5a) and Runx-2 (Fig. 5b) in comparison with the non-treated surface samples. These differences were significant on day 14 for OPN and on day 7 for RUNX-2. On day 28, both genes showed significant differences when compared with the non-treated surface samples.

DISCUSSION

It has been shown that a prerequisite for a successful implant is rapid osseointegration and long-term stability. In both cases, the implant surface is of paramount importance. Surface properties of biomaterials play a critical role in the establishment of the cell-biomaterial interface³⁸. The results presented in this study demonstrate that a biomimetic modified surface has beneficial effects on these osteoinduction-related processes in vitro. These positive effects observed in the mesenchymal cell behaviour are due to a combination of factors involving topography, microstructure and surface chemistry. It has been widely reported that surface roughness by itself has a great effect on osteoblast attachment, proliferation and differentiation^{21,32,36-38}. Most studies comparing the influence of surface modifications on titanium implants to determine adhesion, proliferation or differentiation properties have used osteoblast cell lines. However, in this study we have decided to use human mesenchymal stem cells because they are closer to the actual physiological conditions and play a key role in the osseointegration physiological process. Mesenchymal stem cells are undifferentiated pluripotent cells present in bone marrow, capable of differentiating into many cell types (chondrogenic, adipogenic, or osteogenic lineages) and may be a suitable autogenous cell source for tissue regeneration. Together with cells coming from the blood, the MSCs are the cells responsible for the first contact with the surface of titanium implants³⁹⁻⁴¹. The adhesion of these cells to a biomaterial surface can be a major factor mediating its biocompatibility. A high degree of cell adhesion to the surface allows a strong attachment of the surrounding tissue to the biomaterial. In our study, we have observed that hMSCs were able not only to attach significantly better to treated surface titanium discs than to untreated ones, but also to significantly increase their number. This improvement in cell adhesion is in accordance with other authors⁴²⁻⁴³ and could be explained due to the greater surface area obtained in our surface modification. This increased area in the surface modified titanium discs could be coupled to a higher protein adsorption coming from the serum of the cell culture medium. Protein adsorption and matrix remodelling at the cell-material interface has been previously described as a potent cell adhesion inductor⁴⁴. Other previous works are also in concordance with our adhesion and proliferation results^{26,45}. SEM observation showed that cells cultured on the treated surfaces formed multicellular layers completely covering the whole sample while those cultured on the untreated ones proliferated but did not form layers. In our study we have also been able to induce the expression of osteogenic differentiation markers (Runx-2 and osteopontin (OPN)) in the absence of any chemical differentiation inducer. Runx-2 is an early osteogenic marker and serves as a critical bone cell transcription factor. It has been previously demonstrated that Runx-2 is essential for osteoblast differentiation, gene expression of bone matrix proteins, bone formation, and tooth development and that it determines the lineage of osteoblasts from mesenchymal cells as well as regulating many bone and tooth related genes^{46,47}. A higher expression of this gene seems to be related with higher mineralization. However, OP is a late osteogenic marker and its expression is increased as a late event meanwhile Runx-2 increases as an early event on differentiation. It has been proposed that OP plays an important functional role not only in matrix calcification of hard tissues, but also in the adhesion, spreading, and migration of cells⁴⁸⁻⁵¹. However, the mechanism regulating its activity remains unclear^{22,57}. In Fig. 5, it could be observed that the temporal distribution of the differentiation markers are in accordance with the previously described in literature⁴⁶. An early increase of Runx-2 in day 7 is followed by a higher OP mRNA expression in day 14. Both differentiation markers have been also described as important players in matrix mineralization^{46,47}. These could be the reason why both differentiation markers are overexpressed in day 28. This molecular sequence has been achieved, in our study, in the absence of any differentiation media but in contact with a biomimetic modified surface. Consequently, taking all these in vitro results together, it can be concluded that using Ti-implants with BAS treated surfaces for orthopaedic or dental prostheses could improve the osseointegration and osteoconduction processes in humans, stimulating the bone-marrow mesenchymal stem cell proliferation, adhesion and differentiation to osteoprogenitor fates in the absence of any differentiation molecule. These results demonstrate that surface modification is an important parameter able to modify cell behaviour that should be taken into consideration for the improvement of implant design.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) through the CIBER initiative. Titanium discs were unconditionally donated for this study by Avinent (Barcelona, Spain). The authors thank Lot-Oriel for their kind support in topographical characterization and also to Guillermo Antorrena and Carolina Prozzi for their technical support.

Piśmiennictwo do wglądu w redakcji.

Artykuł był wcześniej opublikowany w Dental Materials Journal 2012; 31(5): 843–850