

# WPLÝW RÓŻNEJ NANOTOPOGRAFII WARSTW AZOTOWANYCH NA ADHEZJĘ PŁYTEK KRWI

AGNIESZKA SOWIŃSKA<sup>1\*</sup>, MICHAŁ TARNOWSKI<sup>2</sup>,  
WITOLD JAKUBOWSKI<sup>3</sup>, JUSTYNA OLEKSIAK<sup>1</sup>,  
TADEUSZ WIERZCHOŃ<sup>2</sup>, ELŻBIETA CZARNOWSKA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> INSTYTUT „POMNIK - CENTRUM ZDROWIA DZIECKA”,  
ZAKŁAD PATOLOGII,

AL. DZIECI POLSKICH 20, 04-730 WARSZAWA

<sup>2</sup> POLITECHNIKA WARSZAWSKA,

WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ,

UL. WOŁOSKA 141, 02-507 WARSZAWA

<sup>3</sup> POLITECHNIKA ŁÓDZKA, ZAKŁAD BIOFIZYKI,

UL. B. STEFANOWSKIEGO 1/15, 90-924 ŁÓDŹ

\* E-MAIL: A.SOWINSKA@CZD.PL

## Streszczenie

Oddziaływanie nanotopografii biomateriałów na biogodność z krwią jest nadal słabo poznane. Wiadomo, że azotowane warstwy powierzchniowe z zewnętrzną strefą azotku tytanu (TiN) charakteryzują się dobrymi właściwościami i biogodnością zarówno w kontakcie z krwią, jak i kością. Dlatego też modyfikacje właściwości powierzchni dla zastosowań w kardiologii są nadal przedmiotem zainteresowania i były celem naszych badań. W pracy przedstawiono wyniki badań właściwości warstw azotowanych wytwarzanych w warunkach wyładowania jarzeniowego na stopie tytanu Ti6Al4V w niskotemperaturowym procesie, na potencjale katody i na potencjale plazmy. Uzyskane warstwy miały różną topografię i chropowatość powierzchni w skali nano. Zewnętrzna strefa warstwy typu TiN+Ti<sub>2</sub>N+αTi(N) wytworzonej na potencjale katody (TiN-K) charakteryzowała się wyższą chropowatością w porównaniu z warstwą wytworzoną na potencjale plazmy (TiN-P) (Ra = 0,177 μm dla TiN-K vs. Ra = 0,019 μm dla TiN-P). Ponadto przeprowadzone badania zwilżalności wykazały wysoką zwilżalność powierzchni TiN-K (38° dla TiN-K vs 89° dla TiN-P). Badania biologiczne składu biofilmu wykazały niższą adsorpcję fibrynogenu oraz adhezję, agregację i aktywację płytek krwi na TiN-K w porównaniu do TiN-P. Uzyskane wyniki wskazują, że adhezja płytek krwi, jak i ilość zaadsorbowanego fibrynogenu koreluje z topografią powierzchni warstwy TiN. Zatem poprzez zmianę topografii powierzchni można wpływać na oddziaływanie płytek krwi z biomateriałem.

**Słowa kluczowe:** powierzchniowe warstwy azotowane, chropowatość, zwilżalność, hemozgodność

[Inżynieria Biomateriałów 119 (2013) 27-32]

## Wprowadzenie

Warstwy azotowane produkowane w warunkach wyładowania jarzeniowego mają charakter dyfuzyjny i wykazują dobrą biogodność z różnymi ludzkimi komórkami [1,2]. Modyfikacje topografii powierzchni, które mogą odpowiednio do specyficznych zastosowań (w tym dla sztucznego serca, stentów) zwiększać biogodność biomateriałów nie są nadal dobrze poznane [3].

# EFFECT OF NITRIDED SURFACE LAYERS WITH DIFFERENT NANOTOPOGRAPHY ON PLATELETS ADHESION

AGNIESZKA SOWIŃSKA<sup>1\*</sup>, MICHAŁ TARNOWSKI<sup>2</sup>,  
WITOLD JAKUBOWSKI<sup>3</sup>, JUSTYNA OLEKSIAK<sup>1</sup>,  
TADEUSZ WIERZCHOŃ<sup>2</sup>, ELŻBIETA CZARNOWSKA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> CHILDREN'S MEMORIAL HEALTH INSTITUTE,  
PATHOLOGY DEPARTMENT.,

AL. DZIECI POLSKICH 20, 04-730 WARSAW, POLAND

<sup>2</sup> WARSAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,

FACULTY OF MATERIALS ENGINEERING,

UL. WOŁOSKA 141, 02-507 WARSAW, POLAND

<sup>3</sup> TECHNICAL UNIVERSITY OF LODZ, DEPARTMENT OF BIOPHYSICS,

UL. B. STEFANOWSKIEGO 1/15, 90-924 LODZ, POLAND

\* E-MAIL: A.SOWINSKA@CZD.PL

## Abstract

The effect of different topographies of biomaterials at the nanoscale on biocompatibility is still poorly known. It is known that nitrided surface layers with external titanium nitride (TiN) zone exhibit good properties and biocompatibility with blood and bone. However, the surface properties of biomaterials destined for cardiological applications are still a subject of interest for further improvement. Thus, the aim of our investigations was modification of the external zone of the nitrided surface layers produced under glow discharge conditions for cardiological applications. The layers were produced at low temperature using cathode potential and plasma region. These layers exhibited different surface topography and roughness. The external zone of the layer produced on cathode potential (TiN-K) is characterized by higher roughness compared to the layer produced in plasma region (TiN-P) (Ra = 0.177 μm vs. Ra = 0.019 μm) and higher surface wettability (contact angle 38° vs. 89°). Fibrinogen showed its lower adsorption followed also by lower subsequent platelets adhesion, aggregation and activation on TiN-K compared to TiN-P. These suggest that the amount of adsorbed fibrinogen and platelets adhesion correlate with topographical characteristics of TiN surface. Thus, altering surface topography the platelets-biomaterial interactions can be reduced.

**Keywords:** nitrided surface layers, roughness, wettability, haemocompatibility

[Engineering of Biomaterials 119 (2013) 27-32]

## Introduction

Nitrided surface layer produced under glow discharge conditions form diffusion layers with good biocompatibilities with various human cells [1,2]. Modification of surface topography is a strategy which can be applied to increase the biocompatibility of materials destined for specific applications (among others for artificial hearts and stents) [3].

Wiadomo, że warunki procesu mają znaczący wpływ na strukturę i topografię zewnętrznej strefy wytwarzanej warstwy, od której zależy oddziaływanie biomateriał - komórka/tkanka. Badania wskazują, że chropowatość powierzchni wpływa na jej zwilżalność, a to z kolei na skład białek adsorbowanych na powierzchni biomateriału w pierwszych sekundach kontaktu ze środowiskiem biologicznym [4]. Białka te decydują o adhezji i agregacji lub proliferacji komórek, w tym zaadsorbowany fibrynogen jest czynnikiem zwiększającym trombogenną powierzchnię biomateriału [5]. Wyniki badań prezentowane w literaturze wskazują, że obecność znacznych ilości fibrynogenu na powierzchni warstw wytworzonych w warunkach wyładowania jarzeniowego prowadzi do adhezji płytek krwi [6].

Modyfikując proces azotowania jarzeniowego można wytworzyć warstwy typu  $TiN+Ti_2N+\alpha Ti(N)$  o różnych właściwościach powierzchni, w tym strukturze, topografii powierzchni i zwilżalności, które będą zmniejszały adhezję komórek krwi. Dlatego celem naszych badań była weryfikacja właściwości powierzchni warstw azotowanych wytworzonych na stopie tytanu Ti6Al4V w niskotemperaturowym procesie azotowania jarzeniowego w celu poprawy ich hemozgodności.

## Materiały i metody

Próbki stopu tytanu Ti6Al4V o średnicy 8 mm z powierzchniową warstwą azotowaną typu  $TiN+Ti_2N+\alpha Ti(N)$  wytwarzano w warunkach wyładowania jarzeniowego w temperaturze 680°C na potencjale katody lub plazmy. Materiały sterylizowano plazmowo (Sterrad 100, atmosfera  $H_2O_2$ , temp. 54°C, ciśnienie 7 mbar).

Mikrostrukturę warstw badano z zastosowaniem skaningowego mikroskopu elektronowego (Hitachi S-3500N) z EDS. Właściwości zewnętrznej powierzchni materiału oceniano w zakresie morfologii (SEM Hitachi S-3500N), chropowatości (optyczny profilometr skanujący WYKO NT9300), mikrostruktury (mikroskop sil atomowych, AFM, Veeco) oraz zwilżalności wodą dejonizowaną (aparaturę fotograficzną Nikon Coolpix 4500, analiza zdjęć z zastosowaniem programu DROP3).

Dla oceny adsorpcji fibrynogenu próbki materiałów inkubowano przez 2 godziny w temperaturze 37°C z osoczem krwi zdrowych dawców. Biofilm wytworzony na tych powierzchniach utrwalano w 4% paraformaldehydzie i 70% metanolu. Fibrynogen oznaczano przy użyciu przeciwciała anty-ludzki fibrynogen znakowanego FITC (1:100, Millipore) i badano w mikroskopie konfokalnym (Olympus, Japonia). W badaniach adhezji i aktywacji płytek krwi zastosowano bogatopłytkowe osocze (PRP) otrzymywane z krwi zdrowych dawców, które nanoszono na próbki biomateriałów (150  $\mu$ l/próbkę) i inkubowano przez 5 i 30 minut. Po zakończonej inkubacji próbki płukano w celu usunięcia niezadherowanych płytek. Zadherowane komórki utrwalano w 4% buforowanym glutaraldehydzie i odwadniano w wodnych roztworach etanolu o rosnącym jego stężeniu, a następnie napyłano cienką warstwą złota (Fine coater JFC-1200 Jeol) i wizualizowano w mikroskopie skaningowym (Jeol JSM – 7600F). Adsorpcję fibrynogenu i adhezję płytek krwi mierzono morfometrycznie z zastosowaniem programu Cell<sup>sense</sup> (Olympus, Japonia). Wyniki pomiarów przedstawiono jako średnie arytmetyczne  $\pm$  odchylenie standardowe.

## Wyniki i dyskusja

### Właściwości powierzchni

Badania składu chemicznego i rozmieszczenia pierwiastków wykazały, że obie wytworzone warstwy azotowane miały charakter dyfuzyjny i były typu  $TiN+Ti_2N+\alpha Ti(N)$ .

It is known, that conditions of the process influence the surface structure and topography which further modulate interactions between biomaterials and cells/tissues. Observations show that surface roughness affect surface wettability, which influences protein adsorption occurring during the first seconds upon exposure of biomaterial to biological environment [4]. These proteins influence cell adhesion, aggregation and proliferation, whereas fibrinogen increases the thrombogenicity of biomaterial surface [5]. Data presented in literature reveal platelet adhesion due to fibrinogen adsorption on surface layers produced under glow discharge conditions [6].

Modifying the glow discharge nitriding process, different surface structures, topography and wettability of the  $TiN+Ti_2N+\alpha Ti(N)$  layer can be produced and these surface properties might regulate platelet adhesion. Therefore, the aim of our investigations was to analyze nitrated surface layers with different nanoscale topographies of the TiN external zone produced at low temperature plasma process and its effects on haemocompatibility.

## Materials and Methods

Samples of Ti6Al4V alloy with nitrated  $TiN+Ti_2N+\alpha Ti(N)$  type surface layers of 8 mm diameter were produced under glow discharge conditions at temperature of 680°C on cathode potential or in plasma region. Samples produced were sterilized in plasma (Sterrad 100, atmospheric  $H_2O_2$ , temp. 54°C, pressure 7 mbar).

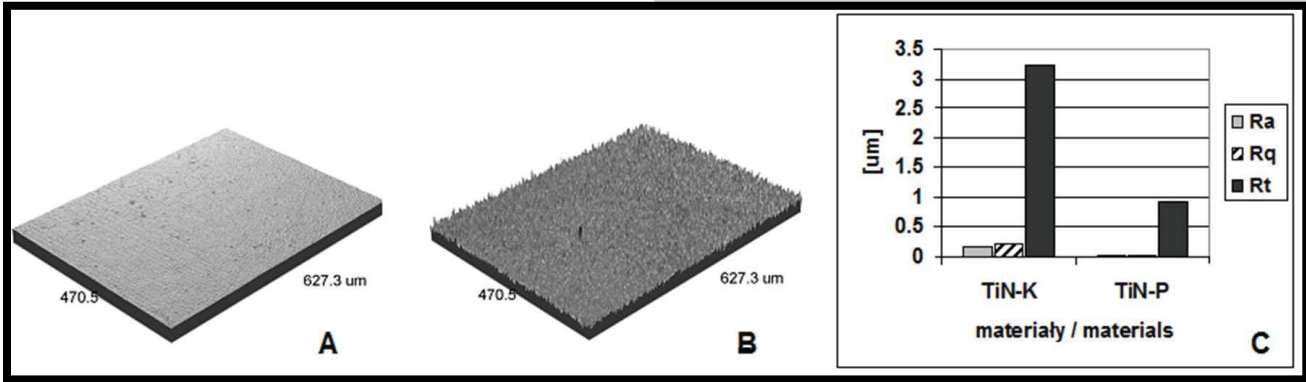
Microstructure of the layers was analysed using scanning electron microscope (Hitachi S-3500N) with EDS. Characteristics of the external surface were investigated for morphology (SEM Hitachi S-3500N), roughness (profilometer WYKO NT9300), microstructure (atomic force microscopy, AFM, Veeco) and wettability by deionised water (imaging by Nikon Coolpix 4500 and measurement with the use of DROP3 program).

For fibrinogen adsorption samples were incubated with fresh human plasma for 2 hours at 37°C. Biofilm produced on the surface was fixed in 4% paraformaldehyde and 70% methanol. Fibrinogen was stained with specific anti-human FITC-conjugated antibody (1:100, Millipore) and investigated using confocal microscope (Olympus, Japan). For determination of platelets adhesion and activation platelets rich plasma (PRP) generated from fresh human blood was applied on biomaterial samples (150  $\mu$ l/sample) and incubated by 5 and 30 min followed by rinsing of the non-adherent platelets. Adhered platelets were fixed in 4% buffered glutaraldehyde and dehydrated in ethanol series, then fine coated with gold (Fine coater JFC-1200 Jeol) and visualized using scanning microscope (Jeol JSM – 7600F). Percent of material surface area occupied by fibrinogen and platelets adhesion were quantified on images with morphometric program Cell<sup>sense</sup> (Olympus, Japan). Results of all measurements were expressed as mean  $\pm$  SD.

## Results and Discussions

### Surface characteristics

Investigations of the chemical composition and distribution demonstrated that nitrated surface layers produced on cathode potential and in plasma region were both diffusion and  $TiN+Ti_2N+\alpha Ti(N)$  type. Investigations of the sample surface using optical profilometer revealed higher roughness of TiN in the external zone of the layers produced on cathode potential (TiN-K) compared to those produced in plasma region (TiN-P) ( $R_a = 0.177 \mu m$ ,  $R_q = 0.229 \mu m$ ,  $R_t = 3.244 \mu m$  vs.  $R_a = 0.019 \mu m$ ,  $R_q = 0.025 \mu m$ ,  $R_t = 0.913 \mu m$ ) (FIG. 1).



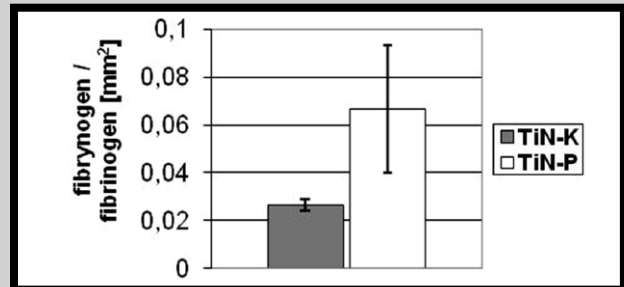
**RYS. 1.** Topografia powierzchni warstw azotowanych wytworzonych w procesie azotowania jarzeniowego na potencjale plazmy (A) i katody (B). Parametry chropowatości powierzchni próbek uzyskane przy pomocy profilometru optycznego; Ra - średnie odchylenie profilu od linii średniej, Rq - średnie kwadratowe odchylenie profilu od linii średniej wzdłuż odcinka pomiarowego lub elementarnego, Rt - odległość najwyższego punktu profilu do najniższego na odcinku elementarnym  $Rt = Rp + Rv$ .

**FIG. 1.** Surface topography of nitrided layers produced under glow discharge conditions on plasma (A) and cathode (B) potential. Roughness parameters of surface layers (optical profilometer); Ra - average arithmetic deviation of the roughness profile, Rq - average square deviation of the roughness profile, Rt - distance between the highest and lowest point of the profile  $Rt = Rp + Rv$ .

Wyniki badań powierzchni próbek przy pomocy profilometru optycznego pokazały, że zewnętrzna strefa TiN warstwy wytworzonej na potencjale katody (TiN-K) charakteryzowała się wyższą chropowatością ( $Ra = 0,177 \mu\text{m}$ ,  $Rq = 0,229 \mu\text{m}$ ,  $Rt = 3,244 \mu\text{m}$ ) w porównaniu do warstwy wytworzonej na potencjale plazmy (TiN-P) ( $Ra = 0,019 \mu\text{m}$ ,  $Rq = 0,025 \mu\text{m}$ ,  $Rt = 0,913 \mu\text{m}$ ) (RYS. 1). Jak wskazywały wyniki badań morfologii powierzchni uzyskane za pomocą AFM, warstwę wytworzoną na potencjale katody charakteryzowała bardziej rozwinięta powierzchnia w skali nano niż warstwę wytworzoną na potencjale plazmy. Warstwa TiN-K miała także większą zwilżalność (kąt zwilżalności wodą dejonizowaną =  $38^\circ$ ) niż warstwa TiN-P (kąt zwilżalności wodą =  $89^\circ$ ). A zatem, powierzchnia TiN warstwy wytworzonej na potencjale katody wykazywała właściwości hydrofilowe, a na potencjale plazmy hydrofobowe. Wiele badań prezentowanych w literaturze wskazuje, że hydrofobowość powierzchni zwiększa interakcję biomateriału ze środowiskiem, co może prowadzić do większej adhezji komórek, podczas gdy hydrofilowość powierzchni jest korzystna dla materiałów kontaktujących się z krwią [7].

### Adsorpcja fibrynogeny

Wizualizacja fibrynogeny w mikroskopie konfokalnym pokazała, że białko to tworzy drobne agregaty jednorodnie rozmieszczone na TiN-K i większe agregaty nieregularnie rozmieszczone na powierzchni TiN-P. Pomiarów obszarów zajętych przez fibrynogen wykazały mniej białka na powierzchni TiN-K w porównaniu z TiN-P (RYS. 2). Z badań prezentowanych w literaturze wynika, że ze wzrostem stopnia rozwinięcia powierzchni oraz jej hydrofobowości rośnie adsorpcja fibrynogeny [8]. Innymi czynnikami charakteryzującymi biomateriał, które odgrywają ważną rolę w zwiększonej adsorpcji białek są wysoka energia powierzchniowa materiału, elektrostatyczne oddziaływanie między cząsteczkami białek i powierzchnią [8]. Biorąc pod uwagę wszystkie badane przez nas właściwości TiN – strefy zewnętrznej wytworzonych warstw, to warstwa wytworzona na potencjale katody prezentowała duży potencjał biokompatybilności z krwią.



**RYS. 2.** Adsorpcja fibrynogeny na powierzchni 1 mm<sup>2</sup> próbek z warstwą azotowaną na potencjale katody (TiN-K) i plazmy (TiN-P).

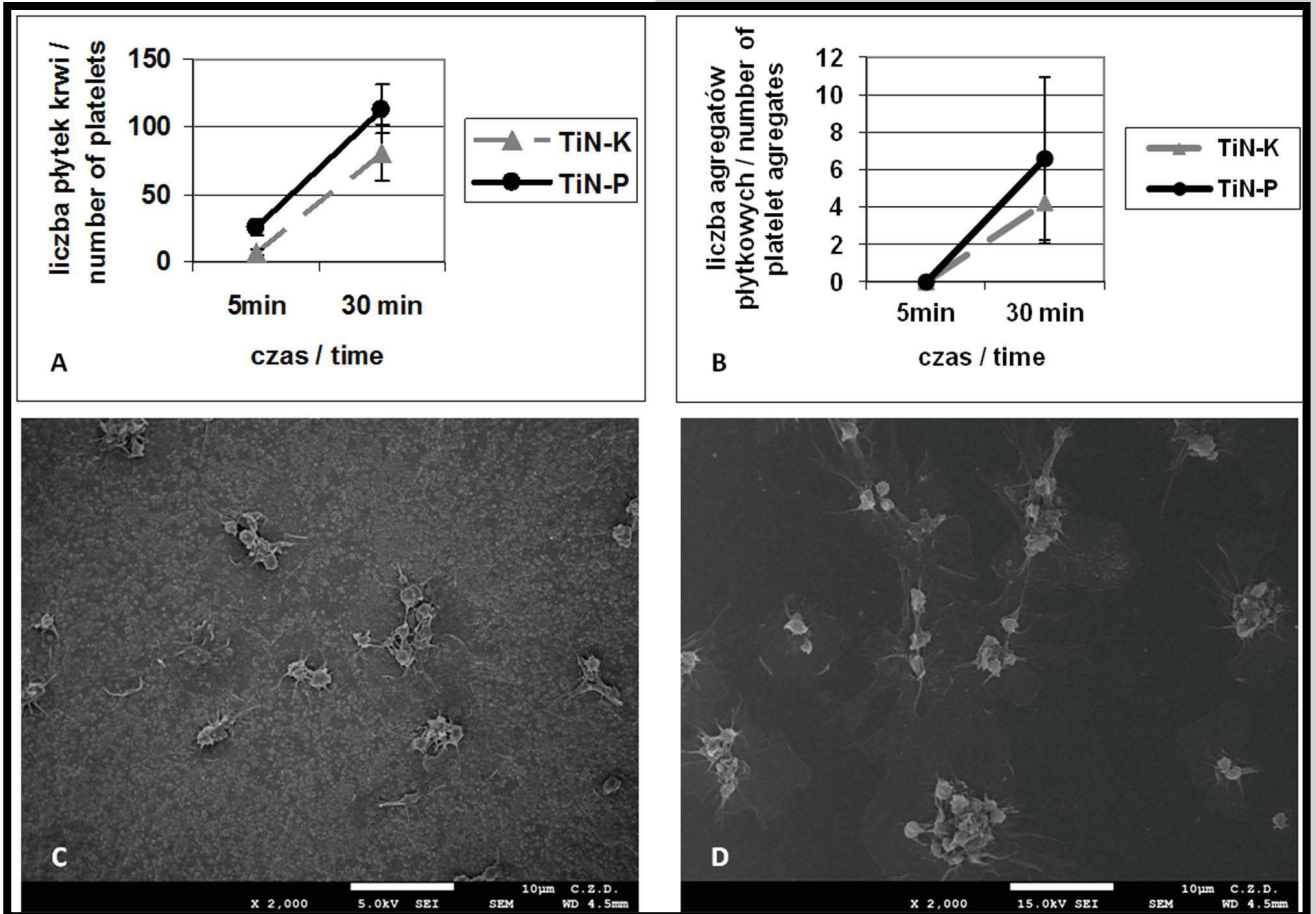
**FIG. 2.** Fibrinogen adsorption on 1 mm<sup>2</sup> of surface layers nitrided on cathode (TiN-K; C) and plasma (TiN-P; D) potential.

The AFM surface analyses showed more developed nano-scale TiN layer produced on cathode potential than in plasma region. The TiN-K exhibited higher wettability (contact angle with deionized water =  $38^\circ$ ) compared to TiN-P layer (contact angle =  $89^\circ$ ). Thus, the TiN surface produced on cathode potential was hydrophilic, while the TiN surface produced in plasma region was hydrophobic. Numerous papers have presented that surface hydrophobicity increases interactions at biomaterial - environment interface leading to increased cell adhesion, while surface hydrophilic feature was advantageous for biomaterials in contact with blood [7].

### Fibrinogen adsorption

Fibrinogen visualization demonstrated that this protein forms fine aggregates homogeneously spread on TiN-K and significant aggregates irregularly spread on TiN-P. Measurements of areas occupied by fibrinogen revealed lower covered surface area on TiN-K than on TiN-P (FIG. 2). Some of literature data have documented increased fibrinogen adsorption with surface development and hydrophobicity [8]. Other factors which play a significant role in protein adsorption are high surface energy and electrostatic interaction between proteins and biomaterial surface [8]. All properties of the TiN layers analysed in our study suggest that the layer produced on cathode potential might exhibit increased potential as blood biocompatible surface.





**RYS. 3.** Liczba płytek krwi (A) i agregatów płytkowych (B) w mikroobszarach 1,42 mm<sup>2</sup> warstw azotowanych na potencjale katody (TiN-K) i plazmy (TiN-P).  
**Morfologia płytek krwi zadherowanych na warstwach azotowanych na potencjale katody (C) i plazmy (D).**  
**FIG. 3.** Number of blood platelets (A) and platelet aggregates (B) in microregions 1.42 mm<sup>2</sup> of layers nitrated on cathode (TiN-K) and plasma (TiN-P) potential.  
**Morphology of blood platelets adhered on surface layers nitrated on cathode (TiN-K; C) and plasma (TiN-P; D) potential.**

### Adhezja płytek krwi

Analizy morfometryczne wskazywały na mniejszą adhezję i agregację płytek krwi na powierzchni TiN-K w porównaniu z TiN-P (RYS. 3A, B). Wynik ten pozostaje w zgodzie z mniejszą adsorpcją fibrynogenu na warstwie TiN-K oraz jej właściwościami hydrofilowymi. Wiadomo, że fibrynogen jest jednym z głównych białek pośredniczących w adhezji i aktywacji płytek krwi [6]. Nie można jednak wykluczyć znaczenia dla adhezji komórek krwi obecności innych rodzajów białek na powierzchni biomateriału, m.in. albuminy, która hamuje adhezję płytek [9]. Jednak na tym etapie prowadzonych przez nas badań nie analizowaliśmy adsorpcji albuminy. Ponadto, badania innych autorów wskazują, że wzrost chropowatości powierzchni w skali nano może przyczyniać się do zmian konformacyjnych w strukturze białek, co także może modyfikować stopień adhezji komórek [10,11]. Takiego zjawiska nie można wykluczyć w odniesieniu do prezentowanych przez nas warstw azotowanych.

Populacje płytek zadherowanych na warstwie TiN-K charakteryzował kształt dendrytyczny (RYS. 3C), podczas gdy na TiN-P większość komórek była silnie rozplaszczona i zaokrąglona (RYS. 3D). Jednocześnie, liczba agregatów płytkowych, składających się z 2-4 komórek, była większa na TiN-P (RYS. 3B). Na podstawie wielu badań porównawczych wyróżnia się 5 kategorii morfologicznych płytek krwi od dysko-podobnych przez dendrytyczne do rozplaszczonych, odzwierciedlających rosnący stopień ich aktywacji [12].

### Platelets adhesion

Morphometric analyses showed significantly lower platelet adhesion and aggregation on TiN-K compared with TiN-P (FIG. 3A, B). Since it is known that fibrinogen is one of the major proteins mediating platelet adhesion and activation [6], these results are in agreements with lower fibrinogen adsorption and wettability of TiN-K. It cannot be excluded that other proteins present on biomaterial surface, e.g. albumin, might also inhibits platelet adhesion [9]. However, the relative adsorption of albumin and fibrinogen has not been analysed in this stage of our investigations. Further, increased surface nano-roughness can lead to conformational changes of proteins, which can modify cell adhesion [10,11].

In our study platelets adherent on TiN-K displayed spread-dendritic morphology as shown in FIG. 3C, while spread or fully spread on TiN-P (FIG. 3D). Simultaneously, platelets aggregates consisting of 2-4 cells were more numerous on TiN-P (FIG. 3B). Morphology of activated platelets is classified into 5 categories from disc-like via dendritic to spread platelets, reflecting increasing cell activation [12]. The morphology of platelets on TiN-K suggests low activation state, while platelets on TiN-P were highly activated. These results are in agreement with lower expression of fibrinogen on TiN-K surface [6]. It is suggested that platelets are fully spread only when fibrinogen concentration reaches a proper threshold value [13].

Prezentowane w naszych badaniach komórki na warstwach TiN-K odpowiadały kategorii morfologicznej płytek słabo aktywowanych, a na TiN-P silnie aktywowanych. Wynik ten pozostaje w zgodzie z mniejszą ekspresją fibrynogenu na powierzchni TiN-K, który jak wiadomo również pośredniczy w aktywacji płytek [6]. Sugeruje się, że do silnego rozplaszczania płytek na powierzchni implantu dochodzi gdy stężenie fibrynogenu osiąga odpowiednią wartość [13]. Nasze badania wykazały, że warstwa azotowana TiN o większej chropowatości wytworzona na potencjale katody jest bardziej hemozgodna niż warstwa o mniejszej chropowatości wytworzona na potencjale plazmy, bowiem adsorbuje mniej fibrynogenu, a towarzyszy temu mniejsza adhezja i aktywacja płytek krwi. Efekt biologiczny kontaktu powierzchni TiN-K z osoczem i płytkami krwi jest zgodny ze zwilżalnością tej powierzchni. Chociaż nie można wykluczyć, że wysoka chropowatość powierzchni TiN-K może zmieniać konformację zaadsorbowanych białek, przez co receptory komórek krwi nie mogą połączyć się z odpowiednimi elementami składników macierzy biofilmu.

Zjawisko mniejszej adhezji i aktywacji płytek na powierzchni TiN-K o większej chropowatości niż na gładziej stwierdzony w naszych doświadczeniach pozostaje w zgodzie z obserwacjami hemozgodności azotku tytanu przez innych badaczy [14-16]. Podkreślali oni znaczenie rozwinięcia powierzchni warstwy w skali nano dla hamowania odpowiedzi płytek krwi. Występuje zgodność wyników badań uzyskanych przez Karagkiozaki i wsp. dla nad-stechiometrycznego TiN z naszymi wynikami dla TiN-K, który jest niestechiometryczny [14]. Należy ponadto podkreślić, że badania innych badaczy dotyczyły warstw wytwarzanych metodami PVD i CVD, podczas gdy nasze warstwy zostały wytworzone w warunkach wyładowania jarzeniowego. Warstwy prezentowane przez naszą grupę są dyfuzyjne, a więc o mniejszych naprężeniach własnych niż warstwy adhezyjne. Skoro kliniczne obserwacje wskazują, że stenty z gładszą powierzchnią mogą sprzyjać tworzeniu skrzepów krwi [17, 18], to tym samym warstwy wytworzone w warunkach wyładowania jarzeniowego mogą być bardziej perspektywiczne dla protez naczyniowych.

## Wnioski

W prezentowanych badaniach wykazano, że adhezja i aktywacja płytek krwi zależy od właściwości powierzchni, w skali nanometrycznej, warstwy azotku tytanu wytworzonego w niskotemperaturowym procesie azotowania jarzeniowego. Chociaż nasze poprzednie badania wykazały, że dyfuzyjne warstwy azotku tytanu charakteryzuje małe wykrzepianie krwi, mniejsze niż na stopie tytanu Ti6Al4V [2], to odpowiednio modyfikując proces azotowania jarzeniowego można w większym stopniu zmniejszyć adhezję i agregację płytek krwi. Wytworzona warstwa typu TiN+Ti<sub>2</sub>N+αTi(N) w procesie niskotemperaturowego azotowania jarzeniowego stopu tytanu na potencjale katody ma duży potencjał zastosowania praktycznego dla modyfikacji biomateriałów stosowanych w kardiologii. Właściwości powierzchni tak otrzymanych warstw są przedmiotem dalszych badań.

## Podziękowania

*Projekt został sfinansowany ze środków Narodowego Centrum Nauki przyznanych na podstawie decyzji numer DEC – 2011/01/D/ST8/02931.*

Our investigations showed that nitride surface layer with higher roughness produced on cathode potential is more haemocompatible because its expressed less fibrinogen and therefore less platelet adhesion and activation. These biological effects are consistent with the surface wettability. However, it cannot be excluded, that the roughness of TiN-K can cause protein conformational changes so that the receptors of blood cells cannot adhere to such biofilm matrix.

Decreased platelets adhesion and activation on TiN-K surfaces with higher nanoroughness in our experiments are in agreement with observations of other investigators of titanium nitride haemocompatibility [14-16]. Those investigators have underlined significance of surface roughness in nano-scale on inhibition of platelets response. There is convergence of Karagkiozaki et al. data obtained for overstoichiometric TiN with our data for TiN-K, which is non-stoichiometric [14]. It should be pointed however that investigations presented in literature by others authors have related to surface layers produced with PVD and CVD methods while our to the layers produced in the process under glow discharge conditions. Thus nitride surface layers presented by our group are diffusion layers with lower residual stresses than adhesive layers. Since clinical observations suggest that stents with smoother surfaces may promote thrombosis [17, 18] thus the layers produced under glow discharge conditions seem to be more perspective for application in medical vascular prosthesis.

## Conclusions

In this study it is shown that platelets adhesion and activation are influenced by nano - properties of titanium nitrided surface layer of TiN+Ti<sub>2</sub>N+αTi(N) type. Our previous investigations have shown that nitrided surface layers produced under glow discharge conditions are less thrombogenic than Ti6Al4V titanium alloy surfaces [2], but proper modification of the process conditions allows production of surface layers with properties which decrease platelet adhesion and activation. Thus, topographical manipulation is a significant approach for reduction of thrombogenicity of nitride surface layers. The layer of TiN+Ti<sub>2</sub>N+αTi(N) produced under glow discharge conditions at low temperature on cathode potential might have significance for practical application in cardiology. The surface properties of nitrided surface layers produced on cathode potential or in plasma region are a subject of further research.

## Acknowledgments

*This study was supported by the National Science Centre [DEC - 2011/01/D/ST8/02931].*

## Piśmiennictwo

- [1] Czarnowska E., Wierzchon T., Maranda-Niedbała A., Karczmarewicz E.: Improvement of titanium alloy for biomedical application by nitriding and carbonitriding processes under glow discharge conditions. *J Mat Sci Mater Med* 11 (2000) 73-81.
- [2] Czarnowska E., Morgiel J., Ossowski M., Major R., Sowińska A., Wierzchoń T.: Microstructure and biocompatibility of titanium oxides produced on nitrided surface layer under glow discharge conditions. *J Nanosci Nanotech* 11, 10 (2011) 8917-8923.
- [3] Mitragotri S., Lahann J.: Physical approach to biomaterial design. *Nat Mater* 8 (2009) 15-23.
- [4] Park J.Y., Gemmel C.H., Davies J.E.: Platelet interactions with titanium: modulation of platelet activity by surface topography. *Biomaterials* 22 (2001) 2671-2682.
- [5] Nonckreman C.J., Fleith S., Rouxhet P.G., Dupont-Gillain C.C.: Competitive adsorption of fibrinogen and albumin and blood platelet adhesion on surfaces modified with nanoparticles and/or PEO. *Coll Surf B: Biointerface* 77 (2010) 139-149.
- [6] Cook B.C.: Reactivity of human platelets with immobilized fibrinogen is dedicated by the chemical character of the surface. *Thromb Res* 104 (2001) 39-48.
- [7] MacDonald D.E., Deo N., Markowic B., Stranick M., Somasundaran P.: Adsorption and dissolution behavior of human plasma fibronectin on thermally and chemically modified titanium dioxide particles. *Biomaterials* 23 (2002) 1269-1279.
- [8] Lavenus S., Ricquier J.C., Louarn G., Layrolle P.: Cell interaction with nanopatterned surface of implants. *Nanomedicine* 5 (2010) 937-994.
- [9] Jones M.I., McColl I.R., Grant D.M., Parker K.G., Parker T.L.: Protein adsorption and platelet attachment and activation on TiN, TiC, and DLC coatings on titanium for cardiovascular applications. *J Biomed Mater Res* 52 (2000) 413-421.

## References

- [10] Dolatshahi-Pirouz A., Skeldal S., Hovgaard M.B., Jensen T., Foss M., Chevalier J. et al.: Influence of nanoroughness and detailed surface morphology on structural properties and water-coupling compatibilities of surface-bound fibrinogen films. *J Phys Chem* 113 (2009) 4406-4412.
- [11] Roach P., Farrar D., Perry C.C.: Surface tailoring for controlled protein adsorption: effect of topography at the nanometer scale and chemistry. *J Am Chem Soc* 128 (2006) 3939-3945.
- [12] Goodman S.L., Grasel T.G., Cooper S.L., Albrecht R.M.: Platelet shape and cytoskeletal reorganization of polyurethaneureas. *J Biomed Mater Res* 23 (1989) 105-124.
- [13] Park K., Mao F.W., Park H.: Morphological characterization of surface-induced platelets activation. *Biomaterials* 11 (1990) 24-31.
- [14] Karagkiozaki V., Logothetidis S., Kalfagiannis N., Lousinian S., Giannoglou G.: Atomic force microscopy probing platelet activation behavior on titanium nitride nanocoatings for biomedical applications. *Nanomed Nanotech Biol Med* 5 (2009) 64-72.
- [15] Subramanian B., Ananthakumar R., Kobayashi A., Jayachandran M.: Surface modification of 316L stainless steel with magnetron sputtered TiN/VN nanoscale multilayers for bio implant applications. *J Mater Sci: Mater Med* 23 (2012) 329-338.
- [16] Dion I., Rouais F., Trut L., Baquey C., Monties J.R., Havlic P.: TiN coating: surface characterization and haemocompatibility. *Biomaterials* 14 (1993) 169-176.
- [17] Palmaz J.C., Benson A., Sprague E.A.: Influence of surface topography on endothelization of intravascular metallic material. *J Vasc Interv Radiol* 10 (1999) 439-444.
- [18] Hasebe T., Ishimaru T., Kamijo A., Yoshimoto Y., Yoshimura T., Yohena S., Kodama H., Hotta A., Tkahashi K., Suzuki T.: Effects of surface roughness on anti-thrombogenicity of diamond-like carbon films. *Diam Relat Mater* 16 (2007) 1343-1348.