

- [1] D.S. Mao, X.H. Liu, X. Wang, "Electron field emission from diamond-like carbon films and a patterned array by using a Ti interfacial layer", *J. Appl. Phys.*, 91 (2002) 3918-3922.
- [2] J.B. Cui, J. Ristein, L. Ley, "Low-threshold electron emission from diamond", *Phys. Rev.* 60 (2000) 16135-16142.
- [3] P.K. Baumann, R. J. Nemanich, "Negative electron affinity effects on H plasma exposed diamond (100) surfaces", *Diamond Relat. Mat.* 4 (1995) 802-805.
- [4] B.B. Pate, "The diamond surface: atomic and electronic structure", *Surf. Sci.*, 165 (1990) 83-142.
- [5] H. Kawarada, "Hydrogen-terminated diamond surfaces and interfaces", *Surf. Sci. Rep.*, 26 (1996) 205-259.
- [6] J. Robertson, "Amorphous carbon cathodes for field emission display", *Thin Solid Films* 296 (1997) 61-65.
- [7] J.D. Carey, R.D. Forrest, R.U.A. Khan, S.R.P. Silva, "Influence of sp² clusters on the field emission properties of amorphous carbon thin films", *Appl. Phys. Lett.*, 77 (2000) 2006-2008.
- [8] J. Robertson, "Mechanism of electron field emission from diamond, diamond-like carbon, and nanostructured carbon", *J. Vac. Sci. Technol.* B17(1999) 659-665.

- [9] R.G. Forbes, "Low-macroscopic-field electron emission from carbon films and other electrically nanostructured heterogeneous materials: hypotheses about emission mechanism", *Soild-State Electronics* 45 (2001) 779-808.
- [10] N.S. Xu, Y. Tzeng, R.V. Latham, "Similarities in the 'cold' electron emission characteristics of diamond coated molybdenum electrodes and polished bulk graphite surfaces", *J. Phys. D: Appl. Phys.* 26 (1993) 1776-1780.
- [11] N.S. Xu, R.V. Latham, Y. Tzeng, "Field dependence of the area-density of 'cold' electron emission sites on broad-area CVD diamond films", *Electron. Lett.*, 29 (1993) 1596-1597.
- [12] S. Mitura, A. Mitura, P. Niedzielski, P. Couvrat, "Nanocrystalline diamond coatings", *Biomaterials: Vol. 17, Issue 6* (1996) pp 587-595.
- [13] R. Hauert, "A review of modified DLC coatings for biological applications", *Diamond Relat. Mat.*, 12 (2003) 583-589.
- [14] R. H. Fowler, L. Nordheim, "Electron emission in intense electric fields", *Proc. Roy. Soc. Lon. Ser. A* Vol. 119, No. 781 (1928), 173-181.

PŁYTKI KRWI W KONTAKCIE ZE STOPEM TYTANU Ti6Al4V I Z JEGO ZMODYFIKOWANYMI POWIERZCHNIAMI

WIESŁAWA OKRÓJ*, LESZEK KLIMEK*, PIOTR KOMOROWSKI*, BOGDAN WALKOWIAK**

*CENTRUM DOSKONAŁOŚCI NANODIAM, POLITECHNIKA ŁÓDZKA W ŁÓDZIU

**ZAKŁAD BIOFIZYKI MOLEKULARNEJ I MEDYCZNEJ, UNIwersytet MEDYCZNY W ŁÓDZIU

Słowa kluczowe: adhezja płytek krwi, modyfikacja powierzchni, azotek tytanu, węglazotek tytanu, mikroskop skaningowy.

[*Inżynieria Biomateriałów, 43-44, (2005), 13-16*]

Wstęp

W ostatnich latach poszukuje się metod poprawienia właściwości materiałów stosowanych do produkcji implantów. Tytan i jego stopy, ze względu na wyjątkowe właściwości fizyko-chemiczne oraz sprawdzoną biogodność, znajdują szerokie zastosowanie w produkcji implantów na potrzeby ortopedii i stomatologii, jak również w wytwarzaniu narzędzi chirurgicznych. Obróbki jarzeniowe, które umożliwiają wytwarzanie warstw TiN i TiCN na gotowych implantach o dowolnym kształcie, wydają się być obiecującymi metodami poprawienia właściwości materiałów tytanowych [1, 2]. Modyfikowanie powierzchni powoduje poprawę wytrzymałości, wzrost odporności na korozję, na zużycie przez tarcie oraz zapobiega przechodzeniu składników stopów do otaczającego środowiska biologicznego [3-5].

Cel

Celem pracy było porównanie oddziaływania płytek krwi z powierzchniami stopu tytanu (Ti6Al4V) i modyfikowanych

BLOOD PLATELETS IN CONTACT WITH TITANIUM ALLOY Ti6Al4V AND WITH ITS MODIFIED SURFACES

WIESŁAWA OKRÓJ*, LESZEK KLIMEK*, PIOTR KOMOROWSKI*, BOGDAN WALKOWIAK**

*CENTRE OF EXCELLENCE NANODIAM, TECHNICAL UNIVERSITY OF LODZ.

**DEPARTMENT OF MOLECULAR AND MEDICAL BIOPHYSICS, MEDICAL UNIVERSITY OF LODZ.

Key words: platelet adhesion, surface modification, titanium nitride, titanium carbonitride, scanning electron microscopy.

[*Engineering of Biomaterials, 43-44, (2005), 13-16*]

Introduction

New methods capable of improving properties of materials used for implant production are currently being searched. Due to their unique physico-chemical properties and excellent biocompatibility, titanium and its alloys are widely used in a manufacture of implants in orthopaedy and dentistry as well as in a production of surgical instruments. Surface processing, such as glow discharge nitriding and carbonitriding, of titanium based materials, which creates TiN or TiCN layers on ready implants of whichever shape, appears to be a very promising method improving their properties [1,2]. Surface modification enhances their durability, improves their corrosion resistance, decreases friction wear and prevents diffusion of alloy components into a biological environment [3-5].

The aim

The aim of the study was to compare an interaction of blood platelets with the surface of titanium alloy (Ti6Al4V)

Materiały i metody

Próbki

Do badań użyto krążków grubości 3 mm i średnicy 8 mm, wykonanych ze stopu tytanu (Ti6Al4V) i takich samych krążków pokrytych azotkiem tytanu (TiN) i węglazotkiem tytanu (TiCN), o zawartości węgla 4% lub 16% at. C, w procesie azotowania i węglazotowania jarzeniowego. Materiał do badań uzyskano dzięki uprzejmości prof. Tadeusza Wierzchońa z Politechniki Warszawskiej.

Kontakt badanych powierzchni z krwią

Przed eksperymentem próbki umyto dwukrotnie w wodzie destylowanej, a następnie w etanolu w myjce ultradźwiękowej i ponownie w wodzie. Krew pobierano od zdrowych ochotników, którzy nie stosowali żadnych leków antyplateletowych w ciągu trzech tygodni przed badaniem. Cała procedura była zgodna z Deklaracją Helsińską. Jako antykoagulantu użyto 3,8% wodny roztwór cytrynianu sodu. W celu uzyskania osocza ubogopłytkowego (PPP) krew odwirowano (1000xg, 10 min, RT). Wszystkie próbki (Ti6Al4V, TiN, TiCN) umieszczono w PPP na kilkanaście godzin przed eksperymentem i inkubowano w temperaturze 4°C. Następnie próbki płukano dwukrotnie w 0,1 M buforze fosforanowym, pH 7,4, zawierającym 140 mM NaCl (PBS). Tak przygotowane próbki poddano kontaktowi z pełną krwią cytrynianową przez okres jednej godziny, przy zapewnieniu ciągłego ruchu krwi w próbówce. Po zakończonej inkubacji próbki były dwukrotnie przemywane buforem PBS, a następnie utrwalane w 2,5% aldehydzie glutarowym, przygotowanym w 0,1 M buforze fosforanowym, pH 7,4, w ciągu godziny w temperaturze 4°C. Po kolejnym dwukrotnym przemyciu buforem fosforanowym próbki poddano odwodnieniu stosując alkohol etylowy w narastającym stężeniu. Po wysuszeniu próbki poddano napyleniu 20-30 nm warstwą złota (napyłarka JEOL JEE-4X). Obserwacji próbek dokonywano w mikroskopie skaningowym HITACH - 3000 N przy napięciu 5 kV. Dla każdej badanej próbki wykonano 30 zdjęć (powiększenie 1000 i 4000 razy) umożliwiającą opisanie morfologii płytek obecnych na badanych powierzchniach oraz wykonanie statystycznej analizy z użyciem testów Fishera i t-Studenta.

Wyniki

Jednogodzinny kontakt stopu tytanu (Ti6Al4V) z pełną krwią powoduje, że na powierzchni próbek pojawiają się liczne płytki krwi oraz pojedyncze leukocyty. Zaadherowane płytki posiadały długie pseudopodia i przylegały do próbki pojedynczo lub tworząc rozległe agregaty rozmieszczone regularnie na całej powierzchni materiału (RYS. 1a). Podobnie przylegające płytki krwi zaobserwowano na powierzchni azotku tytanu (TiN), gdzie płytki krwi pokrywały badane materiały pojedynczo lub tworzyły agregaty składające się z różnej ich liczby (RYS. 1b). Na próbkach TiCN (4% at.C) i TiCN (16% at.C) stwierdzono obecność płytek krwi kulistego kształtu z nielicznymi i bardzo krótkimi wypustkami. Układały się one zwykle pojedynczo na całej powierzchni (RYS. 1c i RYS. 1d). Największa liczba płytek krwi przylegała do powierzchni azotku tytanu. Na 1 μm^2 przypadło ich średnio 0.011. Najmniej krwinek płytkowych stwierdzono na próbce pokrytej warstwą węglazotku tytanu z 4% zawartością węgla - średnio 0,0042/ μm^2 (RYS. 2). Statystyczna analiza uzyskanych wyników pozwoliła określić stopień agregacji płytek na poszczególnych powierzchniach.

as well as with its modified forms, obtained with the help of glow discharge nitriding (TiN) and carbonitriding (TiCN).

Materials and methods

Samples

Titanium discs (3 mm thick and 8mm in diameter), made of titanium alloy (Ti6Al4V), and identical discs coated with titanium nitride (TiN) and titanium carbonitride (TiCN containing either 4% or 16% at.C) were used. The samples were acquired thanks to the courtesy of Professor Tadeusz Wierzchoń of the Warsaw University of Technology.

Contact of examined surfaces with blood

Before each experiment, samples were washed in a supersonic washer, twice with distilled water then with ethanol and again with water. Blood was collected from healthy volunteers, who had not been using any antiplatelet drugs for three weeks before the experiment. All the procedures were carried out according to Helsinki Declaration. Blood was anticoagulated with 3.8% water solution of sodium citrate. Platelet poor plasma (PPP) was obtained by blood centrifugation (1000xg, 10 min, RT). All the samples (Ti6Al4V, TiN, TiCN) were placed in PPP for several hours before the experiment and were incubated at 4°C. Subsequently, the samples were washed twice with 0.1M phosphate buffer pH 7.4, containing 140 mM NaCl (PBS). The specimens prepared in this way were allowed for one hour contact with citrated whole blood. Blood was constantly kept in motion by end to end mixing. The incubation was finished by a double washing of each sample with PBS and subsequent fixing it with 2,5% glutaraldehyde prepared in 0.1M phosphate buffer. The fixing procedure was carried out for one hour at 4°C, and was followed by a double washing with PBS. Subsequently, samples were dehydrated using ethanol of an increasing concentration. After air drying the samples were coated with 20-30 nm layer of gold (JEOL JEE-4X vacuum evaporator), and they were examined using scanning microscope HITACH-3000 N (voltage of 5 kV). Thirty photographs of every sample were taken (magnification of 1000x and 4000x), enabling description of a morphology of blood platelets present at examined surfaces as well as statistic evaluation of data (Fisher test and t-Student's tests).

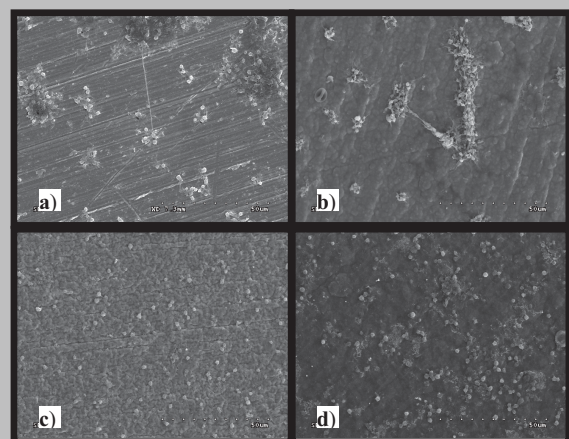


FIG. 1. Badane powierzchnie po 1 godzinnym kontakcie z krwią cytrynianową. a-Ti6Al4V, b-TiN, c-TiCN 4% at.C, d-TiCN 16% at.C .

FIG. 1. Randomly selected surfaces after 1 hour contact with citrated whole blood. a-Ti6Al4V, b-TiN, c-TiCN 4% at.C, d-TiCN 16% at.C.

powierzchnia surface	Liczba płytek w agregacie Number of platelets in an aggregate																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Ti6Al4V	137	60	38	29	22	28	13	9	14	11	9	5	6	7	8	6	1	4	4	0
TiN	14	37	46	67	59	69	81	58	37	46	18	20	10	7	6	9	5	4	4	2
TiCN 16%	3663	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TiCN 4%	1599	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

TABELA 1. Stopień agregacji płytek na badanych powierzchniach.
TABLE 1. Extent of platelet aggregation at observed surfaces.

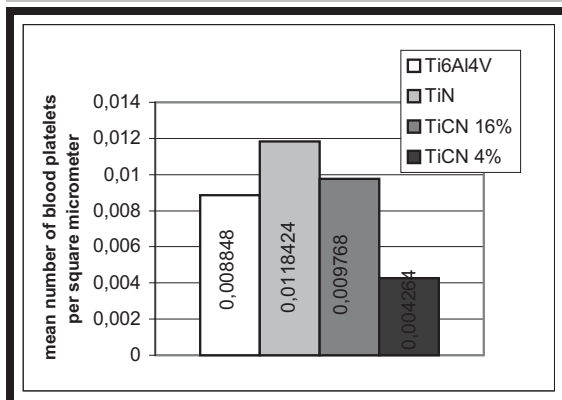


FIG. 2. Średnia liczba płytek krwi przypadająca na 1 μm^2 powierzchni badanych materiałów.
FIG. 2. Mean number of blood platelets adhered to 1 μm^2 of investigated surfaces.

W przypadku powierzchni stopu tytanu i azotku tytanu obserwowano dużą liczbę płytek krwi w powstałych agregatach podczas gdy na powierzchniach węglazotku tytanu brak było agregatów (TAB. 1).

Dyskusja

Jednym z pierwszych procesów zachodzących podczas kontaktu implantu z krwią jest odkładanie się białek osocza na jego powierzchni. Niektóre białka osocza obecne na powierzchni implantu, np. fibrynogen i vWF, pośredniczą w adhezji płytek krwi. Natomiast inne białka, jak albuminy i gamma-globuliny, nie uczestniczą w tym procesie [6, 7]. Aktywacja płytek krwi prowadzi do zmiany ich kształtu, tworzenia pseudopodiów, uwalniania zawartości wewnątrzpłytkowych ziarnistości oraz inicjowania agregacji [8]. Niektórzy autorzy uważają że białka pokrywające wszczep mogą determinować biogodność implantu [9]. Materiałom przeznaczonym do kontaktu z krwią stawia się bardzo wysokie wymagania. Między innymi oczekuje się, że ich powierzchnia nie będzie wywoływała krzepnięcia krwi oraz będzie wolna od zaadsorbowanych elementów morfotycznych, szczególnie płytek krwi [6, 10]. Wykonane badania pozwoliły ustalić, że płytki krwi przylegają do wszystkich badanych powierzchni, jednak w różny sposób i z różną intensywnością tego procesu. Na powierzchni stopu tytanu Ti6Al4V i azotku tytanu (TiN) zaadherowane płytki krwi mają kształt dendrytyczny z licznymi długimi pseudopodiami i tworzą

Results

One hour contact of titanium alloy (Ti6Al4V) with citrated whole blood resulted in an appearance of numerous platelets and single leukocytes on the sample surfaces. The platelets adhered were equipped with long pseudopodia. They were present either as isolated species or in aggregates scattered regularly through the whole surface (FIG. 1a). Blood platelets with long pseudopodia could also be observed adhered to the titanium nitride surface (TiN). They, again, covered the material either as isolated species or created aggregates consisting of different number of platelets (FIG.1b). TiCN (4% at.C) and TiCN (16% at.C) sample surfaces exhibited isolated platelets having spherical shape and equipped with a few very short pseudopodia (FIGs.1c and 1d, respectively). A higher number of adhered platelets was found on the surface of titanium nitride - on average there was 0.011 of a platelet per 1 μm^2 of area. A lower number of blood platelets, 0.0042 of a platelet per μm^2 only (see FIG.2), adhered to titanium carbonitride layer containing 4% atomic C. Statistical analysis of the results enabled a description of the extent of platelet aggregation on different surfaces. Titanium alloy and titanium nitride surfaces exhibited aggregates containing numerous platelets, whereas titanium carbonitride surfaces were free from the aggregates (TAB.1).

Discussion

One of the first processes, taking place during the contact of an implant with blood, is a deposition of plasma proteins on the implant surface. Some plasma proteins, such as fibrinogen and vWF, present on the surface of an implant, mediate blood platelets adhesion. Other proteins, like albumins and gamma-globulins, do not take part in this process [6, 7]. Activation of blood platelets comprises a change of their shape, with the pseudopodia being created, a release of platelet granules content and an initiation of the aggregation process [8]. Some authors claim that proteins covering the implant can determine its biocompatibility [9]. Very strict requirements have to be fulfilled by materials remaining in contact with blood. It is expected that a material surface will not initiate coagulation and will be free from adsorbed blood cells, especially from platelets [6, 10]. Our study indicates that platelets do adhere to every surface, but they adhere in a different manner and at different intensity. The platelets adhered to the surfaces of titanium alloy Ti6Al4V and titanium nitride (TiN) have a dendrite-like shape with long pseudopodia and create aggregates of a different

agregaty płytkowe o różnej wielkości (2-8 płytkowe na Ti6Al4V i 8-12 płytkowe na TiN). W przypadku węglazotków (TiCN) krwinki płytkowe są zaktywane tylko nieznacznie, co manifestuje się zmianą kształtu, brakiem wyraźnych pseudopodiów i brakiem agregatów. Do próbki TiCN (16% at.C) zaadherowało dwukrotnie więcej płytek krwi niż do TiCN (4% at.C). Reasumując, można wskazać węglazotek tytanu o zawartości węgla 4% jako najbardziej trombozgodny materiał spośród badanych.

Podziękowania

Praca częściowo finansowana przez KBN w ramach grantów: 7 P08D 03621 oraz 13/PBZ - KBN - 082/T08/2002

Piśmiennictwo

- [1] Wierzchoń T., Czarnowska E., Marana-Niedbała A., Zegadło-Mylik M.: Obróbki jarzeniowe tytanu i jego stopów w aspekcie zastosowań w medycynie. *Inżynieria Materiałowa* 2/1999 57-61.
- [2] Major B., Wierzchoń T., Ebner R., Klimpel A., Maranda-Niedbała A., Branstatter E., Kružel G., Gruca R.: Structure and properties of titanium based layers produced using advanced methods. *Inżynieria Materiałowa* 5/2001, 611-615.
- [3] Maranda-Niedbała A., Wierzchoń T., Czarnowska E.: Struktura i właściwości warstw powierzchniowych wytworzonych na stopie tytanu Ti-1Al-1Mn w warunkach wyładowania jarzeniowego. *Inżynieria Materiałowa* 5 (2001), 611.
- [4] Czarnowska E., Wierzchoń T., Marana - Niedbała A.: Properties of the surface layers on titanium alloy and their biocompatibility in in vitro tests. *Journal of Materials Processing Technology* 92-93 (1999), 190-194.
- [5] Takadoum J., Houmid Benneni H., Allouard M.: Friction and wear characteristics of TiN, TiCN and diamond-like carbon films. *Surf Coat Technol* 88 (1996), 232-238.

size (2-8 platelets on Ti6Al4V and 8-12 platelets on TiN). For a contrast, the platelets adhered to carbonitride (TiCN) surfaces are only slightly activated - with a shape change, lack of pseudopodia and lack of aggregation. It is worth to note, that twice as many platelets adhered to the TiCN (16% at.C) surface than to the TiCN (4% at.C) surface. In a conclusion it can be stated that, among the examined materials, titanium carbonitride with 4% of carbon exhibit the lowest activating properties.

Acknowledgements

This work was partially supported by KBN grants no. 7 P08D 03621 and 13/PBZ - KBN - 082/T08/2002

References

- [6] Jones M.I., McColl I.R., Grant D.M., Parker K.G., Parker T.L.: Hemocompatibility of DLC and TiC-TiN interlayers on titanium. *Diam. Relat Mat* 8,1999, 457-462.
- [7] Jones M.J., McCall J.R., Grant D.M., Parker K.G., Parker T.L.: Protein adsorption and platelet attachment and activation on TiN, TiC and DLC coating on titanium for cardiovascular applications. *J Biomed Mater Res* 52, 2000, 413-431.
- [8] Park J.Y., Davies J.E., Red blood cell and platelet interactions with titanium implant surfaces. *Clin Oral Implant Res* 2000, 11, 530-539.
- [9] Zeng H., Chittur K.K., Lacefield W.R., Analysis of bovine serum albumin on calcium phosphate and titanium surfaces. *Biomaterials* 1999, 20, 377-384.
- [10] Courtney J.M., Lamba L.M., Sundaram S., Forbes C.D.: Biomaterials for blood contacting applications. *Biomaterials* 15, 1994, 737-744.

PRZYGOTOWANIE BIOSENSORA SPR, PRACUJĄCEGO W REALNYM CZASIE, DO BADANIA ODKŁADANIA SIĘ BIAŁEK NA POWIERZCHNI TYTANU I NA WARSTWACH NCD

MARTA KAMIŃSKA*, JACEK SZYMAŃSKI**, BOGDAN WALKOWIAK*

*CENTRUM DOSKONAŁOŚCI NANODIAM, POLITECHNIKA ŁÓDZKA

**CENTRUM DOSKONAŁOŚCI MOLMED, UNIWERSYTET MEDYCZNY W ŁÓDZI

Streszczenie

Adsorpcja i odkładanie się białek osoczowych na sztucznych powierzchniach implantów medycznych, wspomaga proces adhezji komórek. Zjawisko to stanowi poważny problem w implantologii. Użycie biosensory SPR, pracujących w systemie BiaCore,

PREPARATION OF REAL TIME SPR-BIOSENSORS FOR STUDY OF PROTEIN DEPOSITION AT TITANIUM AND NCD SURFACES

MARTA KAMIŃSKA*, JACEK SZYMAŃSKI**, BOGDAN WALKOWIAK*

*CENTRE OF EXCELLENCE NANODIAM, TECHNICAL UNIVERSITY OF ŁÓDZ, POLAND,

**CENTRE OF EXCELLENCE MOLMED, MEDICAL UNIVERSITY OF ŁÓDZ

Abstract

Adsorption and deposition of plasma proteins at artificial surfaces of medical implants promote cell adhesion process. SPR-biosensors, working in the BiaCore system, enable studies in a real time of the phenomenon of protein deposition onto surfaces of titanium and NCD (nanocrystalline diamond). It was shown, that sensors covered with very thin layers (less than 30 nm) of both, titanium and NCD, exhibit simi-