

agregaty płytkowe o różnej wielkości (2-8 płytkowe na Ti6Al4V i 8-12 płytkowe na TiN). W przypadku węglazotków (TiCN) krwinki płytkowe są zaktywowane 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 Łodzi

Streszczenie

Adsorpcja i odkładanie się białek osoczowych na sztucznych powierzchniach implantów medycznych, wspomaga proces adhezji komórek. Zjawisko to stanowi poważny problem w implantologii. Użycie biosensorów 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 ŁÓDŹ, POLAND,

**CENTRE OF EXCELLENCE MOLMED, MEDICAL UNIVERSITY OF ŁÓDŹ

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-

umożliwia badania odkładania się białek na powierzchniach tytanu i na warstwach NCD (nanocrystalline diamond), w realnym czasie trwania procesu. Pokazano, że sensory pokryte bardzo cienkimi warstwami (poniżej 30 nm), zarówno tytanu jak i NCD, charakteryzują się czułością porównywalną do czułości sensora kontrolnego.

Słowa kluczowe: BiaCore, plazmonowy rezonans powierzchniowy, warstwy węglowe, adsorpcja białek. [Inżynieria Biomateriałów, 43-44, (2005), 16-20]

Wstęp

Oddziaływanie powierzchni biomateriałów z płynami ustrojowymi ma zasadnicze znaczenie w określaniu ich biogodności. Wiadomo, że adsorpcja i odkładanie się białek osocza krwi na sztucznych powierzchniach implantów, ma decydujące znaczenie w procesie adhezji komórek - zarówno elementów morfotycznych krwi, osteoblastów, komórek endotelialnych i innych komórek organizmu biorcy, jak i bakterii. W konsekwencji zjawisko to może być pozytywną cechą biomateriału (osteointegracja), lub prowadzić do utraty funkcjonalności implantu i/ lub reakcji zapalnych, niebezpiecznych dla organizmu. Dlatego wydaje się bardzo istotną sprawą monitorowanie interakcji powierzchni biomateriału z białkami zawartymi w płynach fizjologicznych, szczególnie w warunkach ich przepływu. System BiaCore daje możliwość prowadzenia takich badań. Pozwala on na śledzenie oddziaływań molekuł w realnym czasie trwania procesu [1, 2].

Zjawisko SPR

Centrum systemu BiaCore stanowi sensor SPR, wykorzystujący optyczne zjawisko zwane powierzchniowym re-

lar sensitivity as a control gold-surface sensor.

Key words: BiaCore, surface plasmon resonance, carbon coatings, proteins adsorption.

[Engineering of Biomaterials, 43-44, (2005), 16-20]

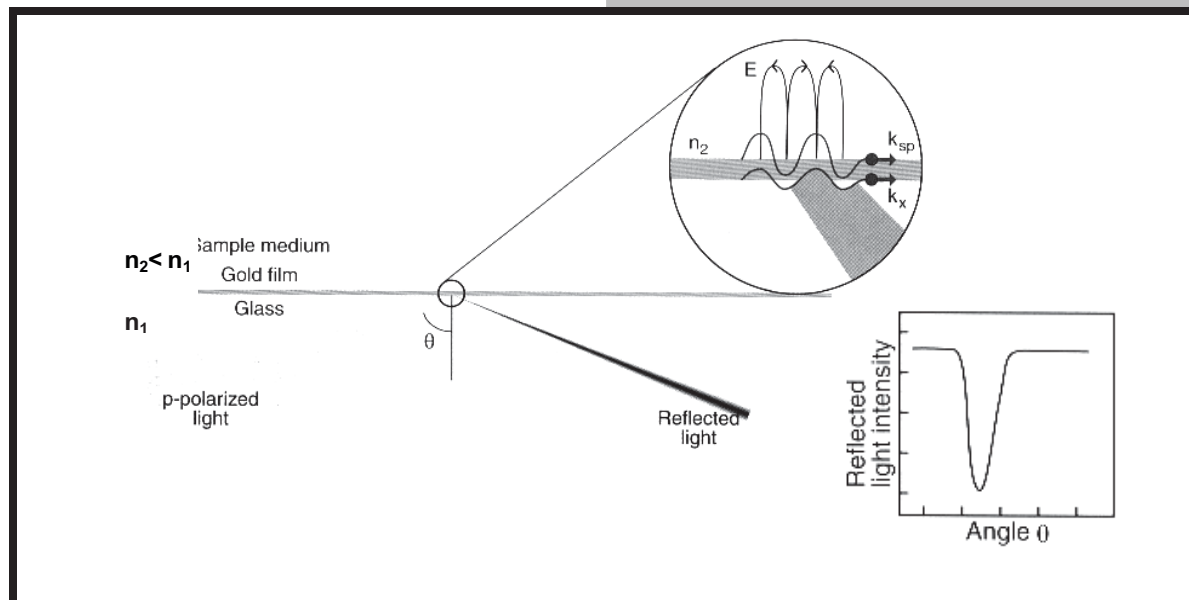
17

Introduction

An interaction of body fluids with biomaterials surfaces is crucial for determination of biocompatibility. It is well known, that adsorption and deposition of plasma proteins on the artificial surfaces of implants promote process of cell adhesion. It concerns of blood cells, osteoblasts, endothelial cells and other type of recipient's cells, as well as bacteria. Consequently, it may be a positive feature of biomaterial (osteointegration), or it can result in functional loss of an implant and/or inflammatory reactions which are dangerous for the organism. Thus, it is very important to monitor interactions of biomaterials with plasma proteins, especially under flow conditions. The BiaCore system enables such the studies. The system allows to monitor interactions of molecules in the real time of the process [1, 2].

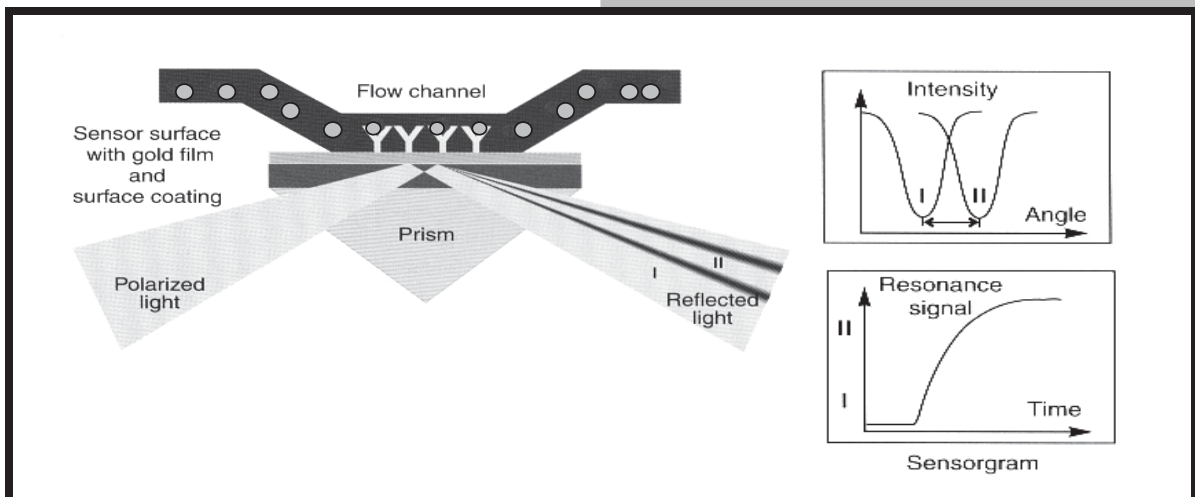
SPR phenomenon

The core of BiaCore system is a SPR-sensor, which employs optical phenomenon referred to as the surface plasmon resonance (SPR). In order to describe SPR, it is helpful to start with the phenomenon of total internal reflection (TIR), which occurs when a light beam, propagates in a medium of higher refractive index, meets an interface at a medium of lower refractive index at an angle of incidence above a critical angle. These media are separated by very thin metallic layer. In these conditions, oscillations of free electrons of metallic layer - plasmon, are excited. Excitation



RYS. 1. Zjawisko całkowitego wewnętrznego odbicia na granicy dwóch ośrodków i wzbudzenie powierzchniowego rezonansu plazmonowego. k_{sp} i k_x są odpowiednio wektorami falowymi plazmonu i padającego światła, natomiast n_1 i n_2 są współczynnikami załamania światła. Ilustracja pochodzi z materiałów promocyjnych firmy BiaCore AB [4].

FIG. 1. The phenomenon of total internal reflection on the boundary of two media and the excitation of surface plasmon resonance. k_{sp} and k_x correspond to a wave vector of plasmon and incidenting light, respectively. n_1 i n_2 are the coefficients of light refraction, respectively. The scheme comes from promotional materials of BiaCore AB company [4].



RYS. 2. Schemat budowy i działania systemu BiaCore. Ilustracja pochodzi z materiałów promocyjnych firmy BiaCore AB [4].

FIG. 2. The scheme presents principle of operation of the BiaCore system. The scheme comes from promotional materials of BiaCore AB [4].

zonansem plazmowym (SPR - surface plasmon rezonanse). Zjawisko to zachodzi gdy fala świetlna pada na granicę dwóch ośrodków, różniących się gęstościami optycznymi, rozdzielonych cienką warstwą metalu, pod kątem większym od kąta granicznego. Następuje wówczas całkowite wewnętrzne odbicie (TIR - total internal reflection) fali świetlnej. Jednocześnie w takich warunkach wzbudzone są oscylacje swobodnych elektronów warstwy metalicznej - plazmonu. Wzbudzenie oscylacji, czyli pochłonięcie przez plazmon ściśle określonej porcji energii, uwidacznia się jako deficyt energii, odczytywany pod określonym kątem odbicia, zależnym od warunków rezonansu. (RYS. 1).

Czujnik SPR najczęściej stanowi szklana płytka pokryta cieniutką warstwą złota (40 - 50 nm). Ta metaliczna warstwa kontaktuje się z kanałem przepływowym, w którym znajduje się badany płyn fizjologiczny. Obecność makrocząstek przy powierzchni sensora zmienia właściwości dielektryczne ośrodka optycznie rzadszego. Rezonans plazmowy jest bardzo czuły na zmiany stałej dielektrycznej. Każda zmiana wartości ϵ tego ośrodka wiąże się ze zmianą warunków rezonansu plazmowego, a więc ze zmianą kąta światła odbitego, dla którego występuje deficyt energii. Istnieje możliwość wyznaczenia masy makromolekuł, znajdujących się przy powierzchni sensora, korzystając z zależności pomiędzy współczynnikiem załamania światła (wartością stałej dielektrycznej) roztworu i stężeniem makromolekuł [5]. Zasadę odczytu zmiany masy przy powierzchni sensora demonstruje RYSUNEK 2.

Cel pracy

Celem badań było znalezienie warunków odpowiednich do przygotowania biosensorów SPR, pokrytych warstwą tytanu lub NCD, pozwalających na obserwację interakcji tych materiałów z przepływającymi makromolekułami.

Materiał i metody

Do badań zastosowano komercyjnie dostępne sensory (SIA-kit) zakupione w firmie BiaCore AB (Uppsala, Szwecja), przeznaczone do samodzielnego pokrywania po-

of oscillations, it means adsorption of very precise portion of energy by plasmon, is revealed as a deficiency of energy, read-out by definite reflection angle.

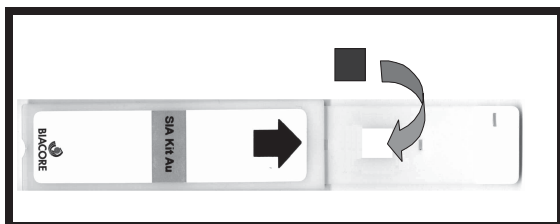
SPR sensor consist of glass plate with a thin gold layer (40-50 nm). This metallic layer is in contact with flow channel, which is filled with tested fluid. The presence of macromolecules at the surface, changes the dielectric properties of lower refractive index medium. The plasmon resonance is very sensitive to changes of dielectric constant (ϵ). The change of ϵ induces modification of plasmon resonance conditions. It results in energy deficiency in the respective angle of reflected light. It is possible to determine the mass of macromolecules, present at the sensor's surface, using the dependence between light reflection coefficient (the value of dielectric constant) of solution and concentration of macromolecules [5]. The principle of read-out of mass change on the sensor surface demonstrates FIGURE 2.

The aim

The aim of this study was to find optimal conditions for preparing SPR sensors, coated with titanium or NCD layers, which allow us for observation of materials in contact with flowing macromolecules.

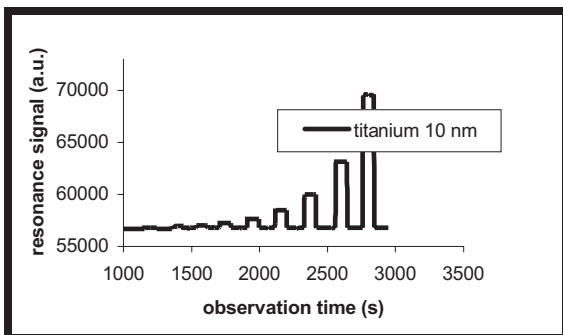
Materials and methods

In this study commercially available sensors (SIA-kit, BiaCore AB, Uppsala, Sweden) predicted for coating with the tested materials were used (FIG. 3). The sensor surface was coated with titanium layer, with thickness of 10, 20 or 30 nm (manufactured by prof. Bogdan Wendler), or with NCD layer, with thickness of around 10 nm. Titanium was deposited using magnetron sputtering whereas NCD was synthesised using RFPCVD method (Radio Frequency Plasma Chemical Vapour Deposition) [3]. A sensitivity of prepared sensors was tested for various concentrations of glucose (0-70%). PBS was used as a basic buffer (10 mM phosphate buffer containing 140 mM NaCl). Platelet poor plasma was used for study of proteins interactions with sensor surface.



RYS. 3. Biosensor SPR z przygotowaną powierzchnią tytanu.
FIG. 3. SPR sensor prepared with titanium layer.

wierzchni czynnej sensora warstwą badanego materiału (RYS. 3). Na powierzchnię sensorów naniesiono warstwę tytanu o grubości 10, 20 lub 30 nm (wykonane przez prof. Bogdana Wendlera), lub warstwę NCD o grubości około 10 nm. Tytan nanoszono przy użyciu magnetronu, natomiast NCD wytworzono metodą RFPCVD (Radio Freqency Plasma Chemical Vapour Deposition) [3]. Czułość tak przygotowanych sensorów testowano dla różnych stężeń glukozy (0-70%). Jako bufor podstawowy stosowano PBS (10 mM bufor fosforanowy zawierający 140 mM NaCl). Do badania oddziaływania białek z powierzchnią sensora użyto ubogopłytkowego osocza krwi ludzkiej.



RYS. 5. Sensogram dla powierzchni sensora z warstwą tytanu (10 nm) oddziaływującego z roztworem glukozy o narastającym stężeniu.
FIG. 5. The sensogram obtained for sensor surface coated with titanium (10 nm) during contact with increasing glucose concentration.

Rezultaty i dyskusja

Obecność warstwy NCD na powierzchni sensora potwierdzono przy pomocy analizy ramanowskiej (RYS. 4). Analiza ta wskazuje na obecność fazy diamentowej (1330 - 1350 nm) i grafitowej (1580 nm).

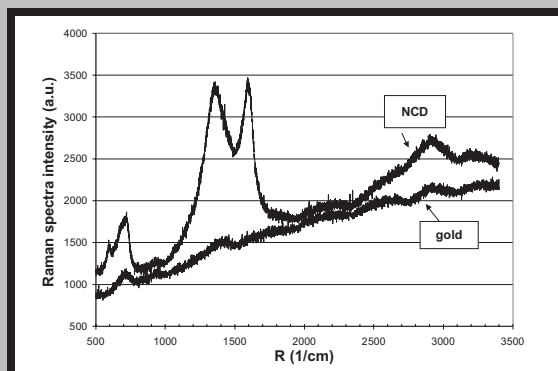
Czułość detekcji poszczególnych sensorów określano stosując glukozę w narastającym stężeniu. RYS.5 przedstawia przykładowy sensogram, uzyskany dla warstwy tytanu o grubości 10 nm. Zwiększająca się wysokość sygnału odpowiada wzrostowi masy (wzrastające stężenie glukozy) przy powierzchni sensora, wynikającej z przepływu płynu o różnej gęstości.

Badania pokazały, że czułość przygotowanych sensorów z warstwą NCD lub tytanu (o grubości warstwy 10 nm) jest porównywalna z czułością sensora kontrolnego (warstwa złota) (RYS. 6). Warstwa tytanu o grubości 20 nm powoduje znaczny spadek czułości sensora, natomiast grubość warstwy tytanu sięgająca 30 nm powodowała utratę

Results and discussion

19

The presence of NCD layer on the sensor surface was confirmed by Raman spectrometry (FIG.4). This analysis



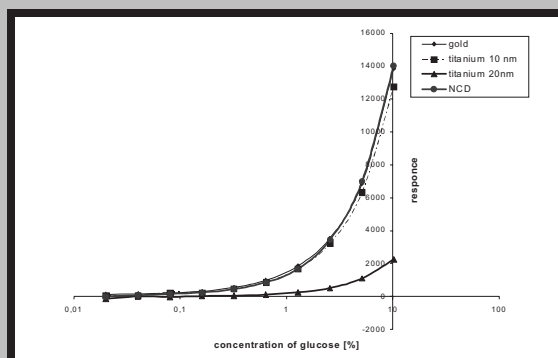
RYS. 4. Widmo Ramana powierzchni sensora przed i po naniesieniu warstwy NCD.
FIG. 4. Raman spectra of sensor surface with and without NCD layer.

confirms the presence of diamond (1330 - 1350 nm) and graphite (1580 nm).

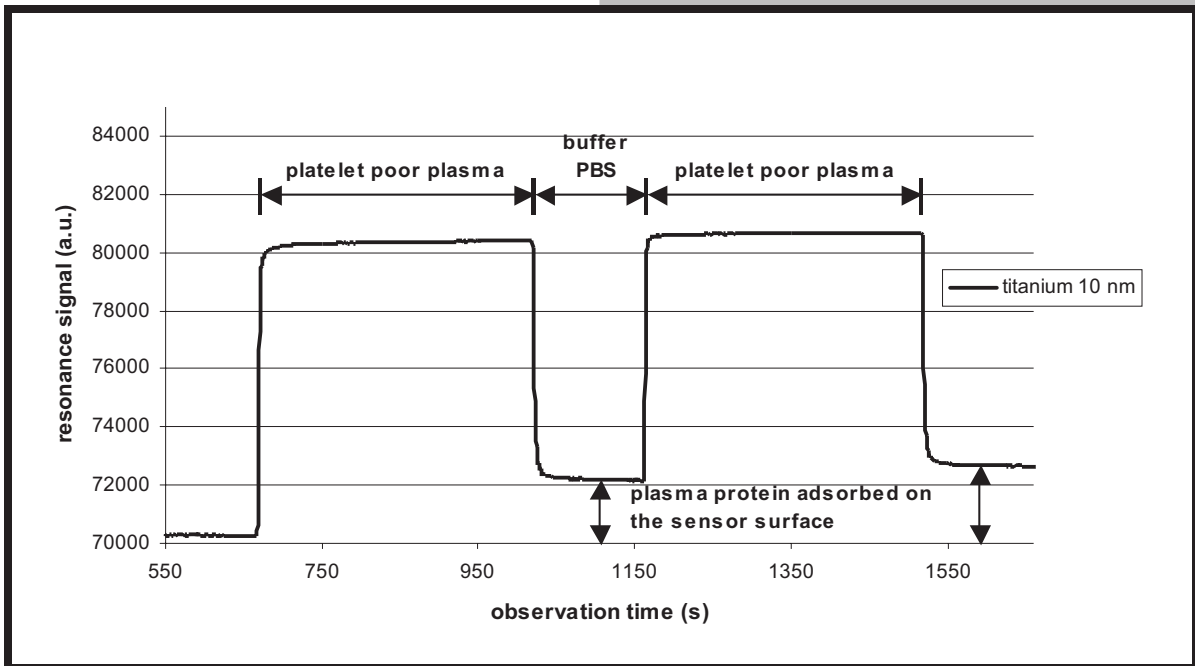
The sensitivity of individual sensor was determined using glucose in increasing concentration. The sensogram obtained for titanium surface, with thickness of 10 nm, is shown at the FIG. 5. The increase in signal value corresponds to the increase of mass (increasing content of glucose) at sensor surface, which results from flow of solution with different concentration.

This study shows, that sensitivity of prepared sensors with NCD layer or titanium layer (thickness of 10 nm) is comparable to sensitivity of control sensor (gold alone) (FIG. 6). The sensitivity decreases when the thickness of the layer reach 20 nm, and is completely lost for layer thickness of 30 nm (FIG. 6).

The preliminary studies performed with titanium coated sensor, tested in contact with blood plasma, showed possibility to read-out a difference of resonance signal value corresponding to the mass of deposited proteins during the flow (FIG. 7).



RYS. 6. Zależność sygnału rezonansu od stężenia glukozy.
FIG. 6. The dependence between signal resonance and glucose concentration.



RYS. 7. Zmiany masy na powierzchni sensora pokrytego warstwą tytanu na skutek interakcji z PPP
 FIG. 7. The difference of resonance signal value resulting from the sensor surface interaction with PPP.

właściwości sensora.

Przeprowadzone wstępne badania oddziaływania powierzchni czynnej sensora tytanowego z osoczem krwi (RYS.7) pokazały, że możliwy jest odczyt różnicy wysokości sygnału rezonansu, odpowiadający masie białek odłożonych na powierzchni sensora w trakcie ich przepływu.

Podziękowania

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

Aknowledgements

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

Piśmiennictwo

- [1] Walkowiak B, Kochmańska V, Jakubowski W, Okrój W, Króliczak V, Interaction of body fluids with carbon surfaces, Journal of Wide Bandgap Materials, 4 (9), 231-242, 2002.
 [2] Green J.R, Frazier A.R, Shakesheff M.K, Davies C.M, Roberts J.C, Saul J.B.T, Surface plasmon resonance analysis of dynamic biological interactions with biomaterials, Biomaterials 21,1823-1835, 2000.

References

- [3] Mitura S, Mitura A, Niedzielski P, Couvrat P, Nanocrystalline Diamond Coatings, Chaos, Solitons & Fractals, 10 (12), 2165-2176, 1999.
 [4] www.biacore.com
 [5] Walkowiak B, Techniki chromatografii cieczowej, wyd. MORPOL, Lublin, 2000.