

WZROST KOMÓREK ŚRÓDBŁONKA NA POWIERZCHNI WYBRANYCH BIOMATERIAŁÓW

HANNA JERCZYŃSKA*, PATRYCJA BARAŃSKA*,
WIKTOR KOZIOLKIEWICZ*, BOGDAN WALKOWIAK**,
ZOFIA PAWŁOWSKA*

*CENTRUM DOSKONAŁOŚCI MOLMED,
UNIwersYTET MEDYCZNY W ŁODZI,
** CENTRUM DOSKONAŁOŚCI NANODIAM,
POLITECHNIKA ŁÓDZKA

Streszczenie

Przeprowadzone przez nas badania wstępne dotyczyły sprawdzenia zdolności do wzrostu komórek śródbłonna ludzkiego na powierzchni wybranych biomateriałów, takich jak stal medyczna, stopy tytanu oraz materiałów modyfikowanych takich jak TiN i NCD (diament nanokrystaliczny). Komórki śródbłonna hodowano na powierzchni próbek, w kształcie dysków. Próbkę wykonano ze stali medycznej (AISI 316 L) w stanie dostawy, stali medycznej polerowanej, stali medycznej polerowanej i pokrytej warstwą NCD, stopu tytanu Ti6Al4V, tego samego stopu pokrytego warstwą NCD oraz stopu tytanu z warstwą TiN. Na podstawie hodowli komórek śródbłonna w ciągu 19 godzin wykazaliśmy, że były one zdolne do wzrostu na każdej z badanych powierzchni biomateriałów, jednak wykazywały różną zdolność do adhezji i przeżycia na każdej z tych powierzchni. Zgodnie z malejącą liczbą komórek znalezionych na badanych powierzchniach, można je uporządkować w następujący sposób: surowa stal medyczna, polerowana stal medyczna, polerowana stal medyczna pokryta warstwą NCD, stop tytanu pokryty warstwą NCD, stop tytanu, i stop tytanu pokryty warstwą TiN. Analiza lizatów komórkowych, z zastosowaniem elektroforezy dwukierunkowej, wykazała znaczne różnice w profilach białkowych komórek hodowanych w obecności różnych biomateriałów.

Słowa kluczowe: biomateriały, NCD, TiN, komórki śródbłonna
[Inżynieria Biomateriałów, 43-44, (2005), 21-24]

Wstęp

Szereg właściwości powierzchni biomateriałów odgrywa znaczącą rolę w powodzeniu zabiegów chirurgicznych z użyciem implantów. Długotrwały kontakt komórek śródbłonna z biomateriałem może mieć kluczowe znaczenie dla przebiegu wielu procesów biologicznych. Odpowiedź komórek endotelialnych na taki kontakt może być bardzo istotnym czynnikiem w powstawaniu stanów zapalnych, krzepnięciu krwi, angiogenezie i w wielu innych procesach, w których komórki śródbłonna biorą udział. W przypadku rekonstrukcji naczyń lub chirurgii serca, komórki śródbłonna pozostają w bezpośrednim kontakcie z powierzchnią implantu. Badania oddziaływań komórek śródbłonna z powierzchnią biomateriału są także bardzo ważne w dziedzinie produkcji biomateriałów. Dotychczas niewiele wiadomo na temat właściwości adhezyjnych komórek śródbłonna eksponowanych na kontakt z biomateriałami. Celem tych badań było spraw-

GROWTH OF ENDOTHELIAL CELLS ON SURFACES OF ELECTED BIOMATERIALS

...21...

HANNA JERCZYŃSKA*, PATRYCJA BARAŃSKA*,
WIKTOR KOZIOLKIEWICZ*, BOGDAN WALKOWIAK**,
ZOFIA PAWŁOWSKA*

*CENTRE OF EXCELLENCE MOLMED,
MEDICAL UNIVERSITY OF LODZ,
**CENTRE OF EXCELLENCE NANODIAM,
TECHNICAL UNIVERSITY OF LODZ, POLAND

Abstract

Our preliminary study concerned the ability of human endothelial cells to grow on the surface of selected biomaterials, such as medical steel and titanium alloys, both unmodified and surface modified with TiN and NCD (nanocrystalline diamond). Cells were cultured on the surface of discoidal shape samples of the following materials: crude medical steel (AISI 316 L), polished medical steel, NCD coated polished medical steel, titanium alloy Ti6Al4V, NCD coated titanium alloy, and titanium alloy coated with TiN. Following 19 hours of culture growth of endothelial cells on the above biomaterials, no surface entirely free from the cells was found. It was found, however, that the cells revealed different ability to adhere and grow on each of these surfaces. The sequence of materials exhibiting an order of detected cells, decreasing from the highest number to the lowest one, was as follows: crude medical steel, polished medical steel, NCD coated polished medical steel, NCD coated titanium alloy, titanium alloy and titanium alloy with TiN surface. A 2D electrophoresis of protein lysates of endothelial cells, grown on different biomaterial surfaces, revealed significant differences in protein profile of the cells cultured in the presence of different biomaterials.

Key words: biomaterials, NCD, TiN, endothelial cells
[Engineering of Biomaterials, 43-44, (2005), 21-24]

Introduction

There are several features of biomaterial surfaces that play a fundamental role in a successful use of a surgery implant. A long-term contact of endothelial cells with a biomaterial can be crucial for many biological processes. A response of endothelial cells to this contact may be a high importance factor in the course of such processes as inflammation, blood coagulation, angiogenesis and many others, in which endothelial cells play a key role. In the case of reconstructive arterial or cardiac surgery the cells are in direct contact with an implant surface. Controlling the interaction of cells with biomaterial surfaces is also fundamental to biomaterial industry. Little is known about the adhesive properties of endothelial cells exposed to the contact with biomaterials. The aim of the study was to assess and compare the ability of endothelial cells to grow on the surface of medical steel (AISI 316L), titanium alloys (Ti6Al4V) as well as on the surface of the same materials modified with thin

dzenie i porównanie zdolności komórek śródbłonka do wzrostu na powierzchni stali medycznej (AISI 316L), stopu tytanu (Ti6Al4V) i powierzchniach materiałów modyfikowanych tj. azotku tytanu (TiN) i nanokrystalicznego diamentu (NCD), oraz zbadanie potencjalnych różnic w profilu białkowym komórek hodowanych w kontakcie z wybranymi biomateriałami.

Materiały i metody

Przygotowanie próbek biomateriałów

Próbki stali medycznej AISI 316L oraz stopu tytanu Ti6Al4V przygotowane zostały standardowymi metodami obróbki mechanicznej. Pokrycia NCD na badanych próbkach wykonane zostały w Zakładzie Inżynierii Biomedycznej, Politechniki Łódzkiej, kierowanym przez Prof. Stanisława Miturę. Modyfikację powierzchni stopu tytanu do azotku tytanu (TiN) wykonano w laboratorium Wydziału Inżynierii Materiałowej, Politechniki Warszawskiej, kierowanym przez Prof. Tadeusza Wierzczoń.

Hodowla komórkowa - warunki standardowe

Materiałem badawczym była linia komórek śródbłonka ludzkiego EA.hy 926, otrzymana w wyniku fuzji komórek śródbłonka ludzkiego, pochodzących z żyły pępowinowej, z linią komórkową nowotworu płuc A549 [1]. Komórki EA.hy 926 były hodowane z użyciem pożywki DMEM z dodatkiem 10% surowicy wołowej, antybiotyku oraz HAT (100 μ M hypoxantyny, 0,4 μ M aminopteryny, i 16 μ M tymidyny). Hodowlę prowadzono w temperaturze 37°C, przy wilgotności nasycenia, w atmosferze 5% CO₂.

Hodowla komórek na powierzchni biomateriałów

Przemyte alkoholem (70%) i wysuszone próbki badanych materiałów, krążki: 8 mm średnicy i 2 mm grubości, były umieszczane w oddzielnych studzienkach 48-dołkowych płytek do hodowli komórkowej w 500 μ l pożywki DMEM (10% FBS, 1/250 PS, 1/100 HAT). Do studzienek dodawano następnie 200 μ l zawiesiny komórek EA.hy 926. Komórki hodowano następnie przez 19 godzin w standardowych warunkach. Po inkubacji próbki usuwano delikatnie ze studzienek i na ich powierzchnię наносzono 5 μ l znacznika fluorescencyjnego bis-benzamidyny. Po 15 minutach inkubacji w ciemności, próbki oglądano w mikroskopie fluorescencyjnym (Olympus GX71), a obrazy komórek dokumentowano z użyciem aparatu cyfrowego.

Elektroforeza dwukierunkowa (2D)

Komórki EA.hy 926 hodowano 24 godziny w obecności stali medycznej lub NCD, w standardowych warunkach. Następnie komórki trypsynizowano, przemywano buforem PBS, pH 7,4 i rozpuszczano w buforze lizującym (8M mocznik, 4% CHAPS, 2% bufor IPG 3-10, 1% DTT). Próbki oczyszczano używając zestawu 2-D Clean-Up Kit (Amersham Biosciences) i białka (75 μ g) rozdzielano w żelu metodą elektroforezy dwukierunkowej [2, 3] z użyciem aparatu Multiphor II (Amersham Biosciences). Pierwszy kierunek wykonano na paskach IEF pH 3-10, a drugi kierunek w żelu SDS-PAGE 12,5%. Białka w żelu barwiono srebrem, a uzyskane rozdziały dokumentowano z użyciem skanera optycznego.

Wyniki i dyskusja

Ocenę zdolności adhezyjnych komórek śródbłonka ludzkiego do wybranych biomateriałów przeprowadzono poprzez hodowlę komórek na powierzchni krążków wykonanych ze

films of titanium nitride (TiN) and nanocrystalline diamond (NCD), and to check for any differences in a protein profile of the cells grown in a contact with selected biomaterials.

Materials and methods

Preparation of samples of biomaterials

Samples of medical steel AISI 316L and titanium alloy Ti6Al4V were prepared by standard mechanical processing. NCD coatings were deposited at the Department of Biomedical Engineering, Technical University of Lodz, Poland, headed by Prof. Stanisław Mitura. Titanium alloy surface modification to titanium nitride was performed in the laboratory of Faculty of Materials Sciences, Warsaw University of Technology, headed by Prof. Tadeusz Wierzczoń.

Cell culture - standard conditions

The human endothelial cell line EA.hy 926 is derived from the fusion of human umbilical vein endothelial cells with continuous human lung carcinoma cell line A549 [1]. EA.hy 926 cells were routinely cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium with high glucose, containing 10% FBS, supplemented with HAT (100 μ M hypoxanthine, 0.4 μ M aminopterin, and 16 μ M thymidine), and antibiotics. Culture flasks were maintained at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ and 95% of air.

Cell culture on biomaterials

Samples of the studied materials, having a form of 8 mm in diameter and 2 mm thick discs were washed with 70% ethanol, dried and placed face up in separate wells of 48 well tissue culture plate, and were immersed in 500 μ l DMEM medium (10%FBS, 1/250 PS, 1/100 HAT). The samples were supplemented with 200 μ l of EA.hy 926 cells suspension. The cells were cultured for 19 hours in standard conditions. After that, the samples were gently removed from wells, and 5 μ l of bis-benzamidine, a fluorescent dye, was applied onto each sample surface. After 15 minutes of incubation, in the dark, the samples were inspected with fluorescence microscope (Olympus GX71). The observed cells were documented with a CCD camera.

2D gel electrophoresis

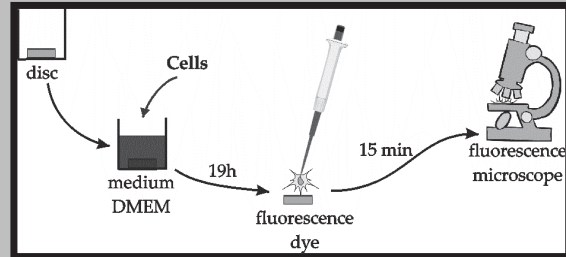
EA.hy 926 cells were cultured for 24h in the presence of medical steel or NCD in a standard conditions. Subsequently, the cells were trypsinized, washed with PBS, pH 7.4 and suspended in a lysis buffer (8M Urea, 4% CHAPS, 2% buffer IPG 3-10, 1% DTT). Samples were purified with Plus One 2-D Clean-up Kit (Amersham Biosciences) and 75 μ g of proteins were separated in 2-D electrophoresis [2, 3] with use of Multiphor II system (Amersham Biosciences). The first direction of electrophoresis was performed with IEF strips, pH 3-10, and the second with 12.5 % SDS polyacrylamide gels. The proteins were detected by silver staining and gels were documented with an optical scanner.

Results and discussion

Adhesive properties of human endothelial cells were evaluated on the basis of their ability to grow, in standard condition, on selected biomaterials, such as medical steel and titanium alloys, both unmodified and surface modified with TiN and NCD. The ability of the cells to adhere and to grow was estimated after 19 hours of incubation, as a number of alive cells found attached to the investigated surfaces. A scheme of the experiment is presented in FIG. 1. Images of living cells, grown in contact with different

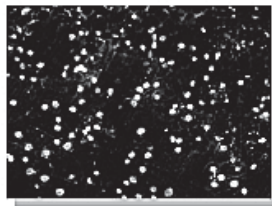
stali medycznej, stopu tytanu i modyfikowanej powierzchni tych materiałów, to jest TiN i NCD. Zdolność do adhezji i wzrostu oceniono na podstawie liczby komórek, które po 19 godzinnej inkubacji były żywe i pozostawały przyklejone do badanego podłoża. Schemat eksperymentu przedstawiony jest na RYS.1.

Obrazy żywych komórek, hodowanych w kontakcie z badanymi materiałami, uzyskane z pomocą mikroskopu fluororoscencyjnego przedstawione są na RYS. 2. Komórki kontrolne hodowane były na standardowych płytkach hodowlanych bez zastosowania jakiegokolwiek biomateriału.. Komórki śródbłonna adherowały w pewnym stopniu do wszystkich badanych materiałów, jednak długotrwały ich kontakt ze sztucznymi powierzchniami, zmienił ich zdolność do przeżycia na zastosowanym podłożu. Biomateriały można następująco uporządkować według malejącej liczby komórek zdolnych do rozwoju na ich powierzchni: zwykła stal medyczna, stal medyczna polerowana, polerowana

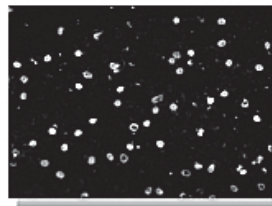


RYS.1. Schemat eksperymentu mającego na celu określenie zdolności komórek śródbłonna do wzrostu na powierzchni biomateriału.

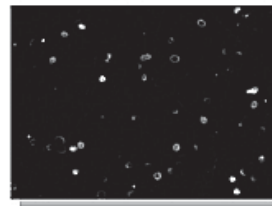
FIG.1. A scheme of the experiment testing the ability of endothelial cells to grow on a surface of a biomaterial.



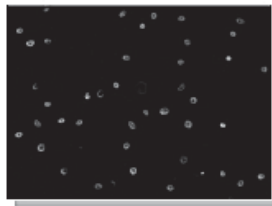
Medical steel



Crude medical steel



Medical steel - NCD



Ti - NCD

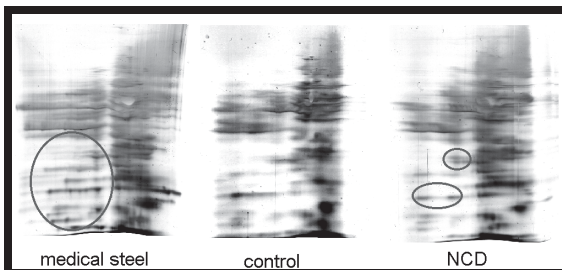


Ti



TiN

RYS. 2. Wpływ wybranych biomateriałów na zdolność komórek śródbłonna EA.hy 926 do wzrostu po 19 godz. hodowli.
FIG. 2. Effect of selected biomaterials on the ability of endothelial cells EA.hy 926 to grow after 19 hrs of culture.



RYS. 3. Typowy żel 2D uzyskany z rozdziału lizatu białkowego komórek śródbłonna hodowanych przez 24 godz. w standardowych warunkach hodowli w obecności stali medycznej oraz w obecności NCD. Zaznaczono obszary zawierające białka o zwiększonej ekspresji w stosunku do kontroli.

FIG. 3. Representative 2D-gels of protein lysates of human endothelial cells grown for 24 hours at standard conditions, in the presence of medical steel or NCD. Circled areas indicate the proteins, that were expressed at a different amount when compared to control cells.

biomaterials, taken under a fluorescence microscope are shown in FIG. 2.

The above images are considered representative for the endothelial cell growth on the examined biomaterials. Control cells were grown in the tissue culture plates in the absence of any biomaterials. Long term contact of endothelial cells with different artificial surfaces, like biomaterials, had various effects on their adhesive properties. The studied biomaterials can be arranged according to a decreased cell number in a following sequence: crude medical steel, polished medical steel, NCD coating polished medical steel, NCD coating titanium alloy, titanium alloy and TiN. This study may be helpful in a selection of biomaterials according to the requirements for the endothelial cells grow on the surface of the implants. Another aim of this study was to test a potential effect of biomaterials on possible changes in protein expression in endothelial cells. Indeed, a separation of endothelial cell proteins with two-dimensional electrophoresis revealed differences in protein pattern of cells cultured in the presence or in the absence of biomaterials (FIG. 3).

There was an increased protein expression, observed after 24 hours incubation, both in cells grown in the presence of medical steel and those cultured with NCD when compared to the control (circled area in FIG. 3). Changes in protein expression were also observed by Carcinci et. al [4]. In osteoblasts having a contact with titanium implants

stal medyczna pokryta NCD, stop tytanu pokryty NCD, stop tytanu i TiN. Uzyskane wyniki wskazują na możliwość selekcji biomateriałów pod kątem potrzeb adhezji komórek śródbłonka.

Celem tych badań było również oszacowanie skali zmian w ekspresji białek w komórkach śródbłonka hodowanych w obecności biomateriałów. Rozdziały białek wykonane z użyciem elektroforezy dwukierunkowej, wykazały istnienie różnic w profilach białkowych komórek śródbłonka hodowanych w kontakcie z biomateriałami lub bez takiego kontaktu (RYS. 3).

Zarówno w przypadku komórek inkubowanych przez 24 godziny w obecności stali medycznej, jak i w obecności NCD, w obrazie białkowym obserwuje się ekspresję dodatkowych, w stosunku do kontroli, białek (obszary zakreślone na RYS. 3). Zmiany w ekspresji niektórych genów obserwowali Carinci ze współpracownikami [4]. Wykazali oni istotne obniżenie ekspresji wielu genów w osteoblastach mających kontakt z implantami tytanowymi. Różnice w odpowiedzi poszczególnych typów komórek na kontakt z materiałem implantu skłaniają do uwagi i dalszych badań. Chociaż kontakt komórek śródbłonka z NCD prowadzi do ekspresji dodatkowych białek w stosunku do kontroli, to jednak kontakt ze stalą medyczną powodował większe zmiany w profilu białkowym. Kolejnym, interesującym etapem naszych poszukiwań będzie próba identyfikacji białek, których ekspresja ulega zmianie pod wpływem kontaktu z biomateriałami.

Podziękowania

Praca powstała dzięki współpracy Centrum Doskonałości MolMed oraz Centrum Doskonałości NANODIAM, finansowanych z funduszy Unii Europejskiej.

BADANIA WARSTW WĘGLOWYCH WYTWORZONYCH NA STOPACH MAGNEZU METODĄ PACVD

MARCIN GOŁĄBCZAK*, PATRICE COUVRAT**

*POLITECHNIKA ŁÓDZKA, UL. STEFANOWSKIEGO 1, 90-924 ŁÓDŹ, POLSKA

**ÉCOLE CATHOLIQUE D'ARTS ET MÉTIERS, 40 MONTÉE ST BARTHÉLEMY, 69321 LYON, FRANCJA

Streszczenie

W pracy przedstawiono metodę wytwarzania warstw węglowych na stopie magnezu AZ31 oraz wybrane wyniki badań dotyczące ich właściwości ochronno-dekoracyjnych. Do wytworzenia warstw węglowych zastosowano metodę PACVD (Plasma Activated Chemical Vapour Deposition), polegającą na rozkładzie metanu w plazmie wysokiej częstotliwości. Prezentowane wyniki badań obejmują: identyfikację wytworzonych warstw węglowych na stopie magnezu, ocenę mikroskopową powierzchni tych warstw oraz testy ich odporności korozyjnej.

the authors have shown a number of genes with downregulated expression. The differences in a response of different cells to a contact with implants require an attention and additional research. Although a contact of endothelial cells with NCD coating results in expression of additional proteins, when compared to the control (not treated cells), an use of medical steel produces still much more changes in the protein pattern. The next, very interesting, stage of our study will be devoted to an identification of proteins subjected to changes in expression after the contact with different biomaterials.

Acknowledgements

This work has been carried out in a cooperation between Centre of Excellence MolMed and Centre of Excellence NANODIAM, both financed by the EU.

Piśmiennictwo

References

- [1] Edgell CJ, McDonald CC, Graham JB: Permanent cell line expressing factor VIII related antigen established by hybridization. Proc Natl Acad Sci USA; 80, (1983), 3734-3737.
- [2] O'Farrell PH: High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J. Biol. Chem., 250, (1975), 4007-4021.
- [3] Berkelman T. et al. 2D Electrophoresis. Principles and Methods. Amersham Biosciences, 1998.
- [4] Carinci F. et al. Analysis of osteoblast-like MG63 cells' response to a rough implant surface by means of DNA microarray. J Oral Implantol. 2003, 29(5), 215-20.

INVESTIGATIONS OF CARBON LAYERS MANUFACTURED ON MAGNESIUM ALLOYS USING PACVD METHOD

MARCIN GOŁĄBCZAK*, PATRICE COUVRAT**

*TECHNICAL UNIVERSITY OF LODZ, STEFANOWSKIEGO 1, 90-924 LODZ, POLAND

**ÉCOLE CATHOLIQUE D'ARTS ET MÉTIERS, 40 MONTÉE ST BARTHÉLEMY, 69321 LYON, FRANCE

Abstract

In the paper the method of manufacturing of carbon layers on A31 magnesium alloy and selected results concerning their decorative and protective properties have been presented. For manufacturing of carbon layers the Plasma Activated Chemical Vapour Deposition method has been applied. The idea of this technology has consisted in the process of excite of dense plasma in methane in a radio frequency field 13,56 MHz at a gas pressure 10-20Pa. Presented investigation results has included: identification of carbon layers manufactured on magnesium alloy, their