

# ZMIANY POJEMNOŚCI ANTYOKSYDACYJNEJ FIBROBLASTÓW PO KONTAKCIE Z WYBRANYMI BIOMATERIAŁAMI

JOANNA MAJAK\*, WITOLD JAKUBOWSKI\*, ANETA BALCERCZYK\*\*,  
PIOTR NIEDZIELSKI\*, BOGDAN WALKOWIAK\*,\*\*\*

\*CENTRUM DOSKONAŁOŚCI NANODIAM, INSTYTUT INŻYNIERII  
MATERIAŁOWEJ, POLITECHNIKA ŁÓDZKA

\*\*ZAKŁAD BIOFIZYKI MOLEKULARNEJ, INSTYTUT BIOFIZYKI,  
UNIwersytet ŁÓDZKI

\*\*\*ZAKŁAD BIOFIZYKI MOLEKULARNEJ I MEDYCZNEJ, UNIwersytet  
MEDYCZNY W ŁÓDZI

**Słowa kluczowe:** fibroblasty, pojemność antyoksydacyjna, glutation, NCD, tytan, stres oksydacyjny  
[Inżynieria Biomateriałów, 43-44, (2005), 63-66]

## Wprowadzenie

Ochrona przed reaktywnymi formami tlenu odgrywa kluczową rolę w fizjologii komórki. Osłabienie tej ochrony prowadzi do stresu oksydacyjnego, co można wykorzystać do oceny stanu fizjologicznego komórki. Zmiany poziomu aktywności antyoksydacyjnej obserwuje się w następstwie warunków niekorzystnych, a potencjalnie niezwiązanych z reakcjami wolnorodnikowymi, takich jak: szok cieplny, infekcje bakteryjne, działanie promieniowania UV [1-4]. Procesy biochemiczne, charakterystyczne dla odpowiedzi na warunki stresu, indukowane są także jako efekt kontaktu komórek z powierzchnią biomateriału. Fakt ten pozwala wykorzystywać obserwacje zmian aktywności antyoksydacyjnej do oceny biogodności materiałów pozostających w kontakcie z komórkami [5, 6].

## Cel pracy

Celem pracy było porównanie zmian w ochronie antyoksydacyjnej fibroblastów hodowanych w kontakcie z wybranymi biomateriałami.

## Materiały i metody

Próbki wykonane ze stali medycznej (AISI 316L) i stopu tytanu (Ti6Al4V) były przygotowane przez polerowanie mechaniczne powierzchni, a następnie podlegały procesowi polerowania elektrochemicznego. Na część próbek została naniesiona warstwa nanokrystalicznego diamentu metodą RF CVPD [7].

Fibroblasty były hodowane w standardowych warunkach: 37°C, 5% CO<sub>2</sub> i 95% wilgotności. Próbki biomateriałów były umieszczane w naczyniu, zawierającym konfluentne komórki, a parametry antyoksydacyjne (całkowita pojemność antyoksydacyjna, stężenie całkowitego glutationu oraz aktywność katalazy) były oceniane po 24 godzinach hodowli.

Komórki izolowano z podłoża hodowli przez trypsynizację. Następnie odwirowywano i zawieszano 2x10<sup>7</sup> komórek

# CHANGES IN AN ANTI- OXIDATIVE CAPACITY OF FIBROBLAST DUE TO A CONTACT WITH SELECTED BIOMATERIALS

63

JOANNA MAJAK\*, WITOLD JAKUBOWSKI\*, ANETA BALCERCZYK\*\*,  
PIOTR NIEDZIELSKI\*, BOGDAN WALKOWIAK\*,\*\*\*

\*CENTRE OF EXCELLENCE NANODIAM, INSTITUTE OF MATERIALS  
SCIENCE, TECHNICAL UNIVERSITY OF LODZ, POLAND

\*\*DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOPHYSICS, UNIVERSITY OF LODZ,  
POLAND

\*\*\*DEPARTMENT OF MOLECULAR AND MEDICAL BIOPHYSICS,  
MEDICAL UNIVERSITY OF LODZ, POLAND

**Key words:** fibroblasts, anti-oxidative capacity, glutathione, NCD, titanium, oxidative stress.  
[Engineering of Biomaterials, 43-44, (2005), 63-66]

## Background

A defense from reactive oxygen species plays a key role in the cell physiology. Weakness of this protection leads to an oxidative stress, which can be used for estimation of physiological condition of cells. Changes in a level of anti-oxidative activity are observed as a result of stressful situations, for example: heat stress, bacterial infections, UV treatment [1-4]. Biochemical processes, typical for a response to stressful conditions, are also induced by cell contact with a biomaterial surface. This fact allows us to use of an anti-oxidative activity for estimation of a biocompatibility of material being in contact with cells [5, 6].

## The aim

A comparison of a total anti-oxidative capacity, a level of glutathione concentration and an activity of catalase, in fibroblasts allowed for contact with selected biomaterials, were undertaken.

## Materials and methods

Samples of stainless steel (AISI 316L) and titanium alloy (Ti6Al4V) were prepared by a lathe processing followed by a mechanical, and subsequently a chemical polishing. Some samples were then subjected to nanocrystalline diamond synthesis on the surface by the RF CVPD method [7].

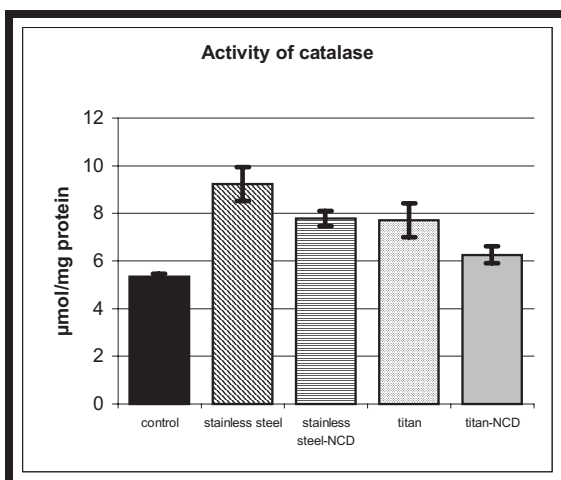
Fibroblast cells were grown in the standard conditions: 37°C, 5% CO<sub>2</sub> and 95% humidity. Samples were put into a T-flask containing confluent cells, and antioxidative parameters (a total anti-oxidative capacity, a level of total glutathione concentration and an activity of catalase) were estimated after 24 hours of incubation. Cells were harvested with trypsin, centrifuged and suspended (2x10<sup>7</sup> cells per ml) in a lysis buffer (10 mM HEPES, pH 7.4, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM DTT, 0.1 mM PMSF, 2 mg/ml leptin, 2 mg/ml aprotinin).

Total anti-oxidative capacity was measured with 2,7-

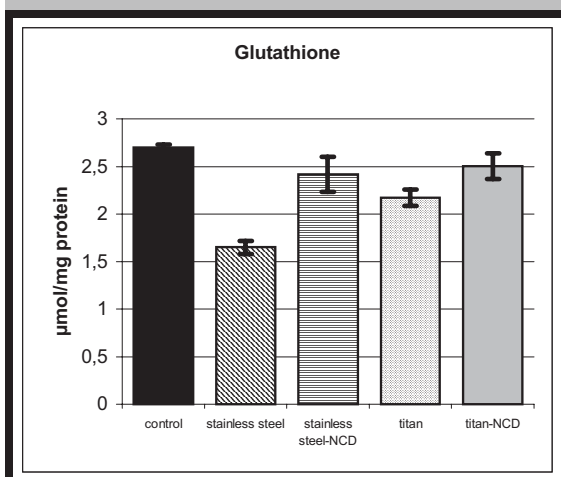
w 1 ml buforu do lizy (10 mM HEPES, pH 7,4, 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mM DTT, 0,1 mM PMSF, 2 mg/ml leptyny, 2 mg/ml aprotininy).

Całkowitą pojemność antyoksydacyjną mierzono przy użyciu spektrofлуorometru Perkin-Elmer LS-5B stosując diocjan 2,7-dichlorofluoresceiny (wzbudzenie i emisja przy długości fali 488 i 520 nm) [8]. Do lizatu komórkowego (1 ml) do dodawano H<sub>2</sub>DCFDA (Molecular Probes) do końcowego stężenie 10 mM. Po 20 min inkubacji w temperaturze 28°C, homogenat komórkowy był odwirowywany (3500 x g, 3 min.) i mierzono jego fluorescencje.

Aktywność katalazy oceniano w homogenatach komórkowych przez dodanie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i pomiar spadku absorpcji przy 240 nm, gdzie szybkość rozkładu nadtlenu wodoru był miarą aktywności katalazy [9]. Objętość 333 µl wodnego roztworu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (54 mM) uzupełniano do 1 ml buforem fosforanowym (50 mM, pH 7,4) i dodawano 100 µl lizatu komórkowego. Mierzono spadek absorbancji przy 240 nm. Rozkład 1 mmol substratu w ciągu 1 min jest miarą jednej jednostki aktywności katalazy.



RYS. 1. Aktywność katalazy w fibroblastach hodowanych w kontakcie z biomateriałami.  
FIG. 1. Catalase activity measured for fibroblasts grown in contact with biomaterials.



RYS. 2. Stężenie glutationu w fibroblastach hodowanych w kontakcie z biomateriałami.  
FIG. 2. Glutathione concentration in fibroblasts grown in contact with biomaterials.

dichlorofluorescein diacetate using Perkin-Elmer LS-5B spectrofluorimeter (excitation and emission wavelengths of 488 and 520 nm, respectively) [8]. The H<sub>2</sub>DCFDA (Molecular Probes) was added into 1 ml of cell homogenate to the final concentration of 10 mM. After 20 min incubation at 28°C, the homogenate was centrifuged (3500 x g, 3 min.) and fluorescence was estimated.

For estimation of catalase activity the cell homogenate was supplemented with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and a rate of fall in the light absorption at 240 nm, corresponding to catalase activity, was measured [9]. The volume of 333 µl of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>water solution (54 mM) was filled up to 1 ml with phosphate buffer (50 mM, pH 7.4) and then 100 µl of cell homogenate was added. Immediately a fall of absorbance at 240 nm was measured. Decomposition of 1 mmol substrate during 1 minute gives 1 unit of catalase activity.

A level of total glutathione concentration was estimated by the cyclic oxidation method. Glutathione was extracted from the cells with 2M of cold HClO<sub>4</sub> (containing 4 mM EDTA). After neutralization with KOH, 100µl of extract sample was supplemented with 50 µl 0.4 % NADPH w 0.5 % NaHCO<sub>2</sub>, 20 µl 0.15% 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) and 20 µl of glutathione reductase solution (activity of 6 U/ml). The rate of absorbance increase, measured at 412 nm, was proportional to glutathione concentration [10].

## Results

An increase in catalase activity for cells, having a contact with all the studied biomaterials, was observed. But the higher level was observed for stainless steel samples (FIG. 1). In the case of a total glutathione concentration, and a total anti-oxidative capacity, a drop in measured values was observed for all samples (FIG. 2 and 3). The highest fall in a total glutathione concentration level, and in an antioxidative capacity, was estimated for fibroblast after a contact with stainless steel, whereas the lowest changes were caused by titanium alloy coated with NCD (FIG. 2 and 3). All the measured parameters differentiated the cells allowed for contact with biomaterials from control ones, and the studied biomaterials can be ordered according to a decreasing difference as follows: medical steel, titanium alloy, medical steel coated with NCD and titanium alloy coated with NCD.

## Discussion

A material introduced into the human body should not induce cell response corresponding to stressful conditions. A comparison of biochemical parameters, undergoing to change in response to cell exposure to unfavourable conditions, has been made in this study. An analysis of differences between control cells and cells allowed for contact with the studied materials permitted biocompatibility estimation of the biomaterials surfaces. One of the most characteristic parameter is the level of catalase activity. An increase in this enzyme activity is observed as a response to most stressful conditions: heat stress, shear stress or oxidizing substances [1, 3, 11].

In the case of fibroblast culture, in the presence of biomaterials, increases in the enzyme activity also occur, and the highest increase was observed in the cells allowed for contact with medical steel. It suggests the lowest biocompatibility of medical steel in respect to contact with fibroblasts.

Similar conclusions result from analysis of a total glutathione concentration and a level of total anti-oxidative capacity of the cells. Glutathione is a tripeptide involved in

Poziom stężenia całkowitego glutationu oznaczany był z użyciem metody cyklicznego utleniania. Glutation był ekstrahowany z komórek przez dodanie zimnego 2M HClO<sub>4</sub> (zawierającego 4 mM EDTA). Do 100µl próbki, zneutralizowanej przez dodanie KOH, dodawano: 50 µl 0,4 % NADPH w 0,5 % NaHCO<sub>2</sub>, 20 µl 0,15% kwasu 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoidowego) i 20 µl roztworu reduktazy glutationowej o aktywności 6 U/ml. Szybkość wzrostu absorbancji, mierzonej przy 412 nm, była proporcjonalna do stężenia glutationu [10].

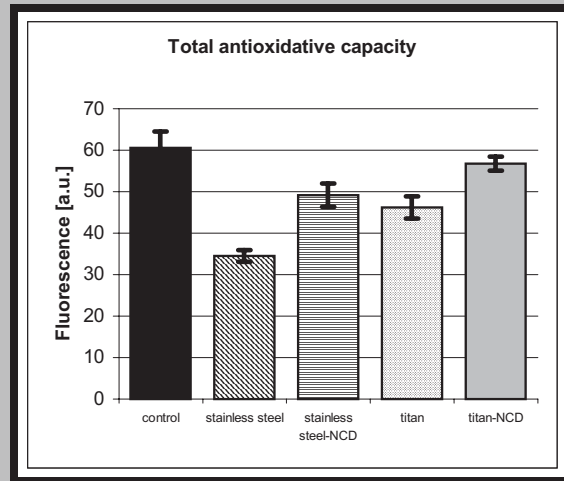
## Rezultaty

We wszystkich komórkach mających kontakt z biomateriałami obserwowano wzrost aktywności katalazy, jednak najwyższy wzrost był obserwowany dla komórek hodowanych w kontakcie z próbkami stali medycznej (RYS. 1). W przypadku oznaczania stężenia całkowitego glutationu i całkowitego poziomu antyoksydacyjnego obserwowany był spadek oznaczanych wartości dla wszystkich prób w odniesieniu do hodowli kontrolnej (RYS. 2 i 3). Największe obniżenie stężenia całkowitego glutationu i całkowitej pojemności antyoksydacyjnej występowało u fibroblastów hodowanych w kontakcie z stalą medyczną, natomiast najmniejsze zmiany tych parametrów powodował kontakt z próbkami stopu tytanu pokrytego warstwą NCD (RYS.2 i 3). Wszystkie oznaczane parametry biochemiczne, uzyskane dla fibroblastów hodowanych w kontakcie z biomateriałami, wykazywały odstępstwa od parametrów komórek kontrolnych, w kolejności od zmian największych do najmniejszych: stal medyczna, stop tytanu, stal medyczna pokryta NCD, stop tytanu pokryty NCD.

## Dyskusja

Materiał wprowadzany do ludzkiego ciała nie powinien indukować odpowiedzi komórkowej charakterystycznej dla warunków stresowych. W przeprowadzonych badaniach porównywano parametry biochemiczne ulegające zmianie w efekcie ekspozycji komórki do niekorzystnych warunków. Analiza różnic między komórkami kontrolnymi a komórkami pozostającymi w kontakcie z materiałem pozwala na ocenę biogodności powierzchni biomateriałów. Jednym z najbardziej charakterystycznych parametrów jest poziom aktywności katalazy. Wzrost ekspresji tego enzymu jest obserwowany w odpowiedzi na większość warunków stresujących, takich jak: stres cieplny, stres mechaniczny czy ekspozycja na substancje utleniające [1, 3, 11]. W przypadku hodowli fibroblastów w obecności biomateriałów także dochodzi do wzrostu aktywności tego enzymu, przy czym najwyższy wzrost obserwowano w komórkach poddanych kontaktowi z powierzchnią stali medycznej. Sugeruje to najniższą biogodność stali medycznej w kontakcie z fibroblastami.

Do podobnych wniosków prowadzi analiza stężenia całkowitego glutationu w komórkach i całkowitej pojemności antyoksydacyjnej. Glutation jest trójpeptydem zaangażowanym w ochronę przed reaktywnymi formami tlenu oraz detoksykację komórki poprzez tworzenie S-konogatów z xenobiotykami [12, 13]. Natomiast całkowita pojemność antyoksydacyjna jest wyznacznikiem ogólnej kondycji komórki, a jej obniżenie świadczy o zaburzeniu homeostazy [13]. W wyniku kontaktu fibroblastów z biomateriałami dochodziło do obniżenia zarówno całkowitego stężenia glutationu (GSSG/GSH), jak i całkowitej pojemności antyoksydacyjnej. Największe różnice obu parametrów, w stosunku do komórek kontrolnych, obserwowano w efekcie kontaktu ze stalą medyczną, co jest zgodne z obserwacjami wzrostu



**RYS.3. Całkowita pojemność antyoksydacyjna fibroblastów hodowanych w kontakcie z biomateriałami.**

**FIG.3. Total antioxidative capacity of fibroblasts grown in contact with biomaterials.**

protection from reactive oxygen species and cell detoxification by formation of S-conjugates with xenobiotics [12, 13]. However a total anti-oxidative capacity is a determinant of homeostasis disturbance [13]. As a result of fibroblasts contact with biomaterials a decrease in a total glutathion concentration (GSSG/GSH) as well as in a total anti-oxidative capacity was observed. The most significant differences, in comparison to the control cells, were observed for medical steel, and it is in good accordance with an increase in the catalase activity. The lowest differences were observed for fibroblasts allowed for contact with NCD surface coating titanium alloy substrate.

Not less interesting is also comparison of results obtained for groups: metal-metal substrate coated with NCD. In all the cases, the presence of NCD surface on a metal substrate, instead of metal alone, significantly reduced differences between parameters obtained for control cells and cells interacting with NCD. The results indicate weaker effect of oxidative stress caused by metallic substrate separated from the cells by NCD layer. In conclusion one can say that surface modification of metallic substrate, by synthesis of NCD layer, increases biocompatibility of the material.

## Acknowledgements

*This work was partially supported by the KBN grant no. 1137/T08/2001/20*

## Piśmiennictwo

## References

- [1] Pigeolet E, Corbisier P, Houbion A, Lambert D, Michiels C, Raes M, Zachary MD, Remacle J: Glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and catalase inactivation by peroxides and oxygen derived free radicals. *Mech Ageing Dev* 1990; 51: 283-297.
- [2] Steinmann M, Moosmann N, Schimmel M, Gerhardus C, Bauer G: Differential role of extra- and intracellular superoxide anions for nitric oxide-mediated apoptosis induction. *In Vivo* 2004; 18: 293-309.
- [3] Heufelder AE, Wenzel BE, Bahn RS: Methimazole and propylthiouracil inhibit the oxygen free radical-induced expression of a 72 kilodalton heat shock protein in Graves' retroocular fibroblasts. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 74: 737-742.
- [4] Meewes C, Brenneisen P, Wenk J, Kuhr L, Ma W, Alikoski J,

aktywności katalazy. Także w przypadku tych oznaczeń wartości oznaczanych parametrów były najbliższe wartościom kontrolnym w komórkach hodowanych w obecności tytanu pokrytego NCD.

Nie mniej interesujące jest porównanie uzyskanych wyników w grupach: metal - metal pokryty warstwą NCD. We wszystkich przypadkach, obecność powierzchni NCD na podłożu metalicznym, zamiast samego metalu, powodowała znaczące obniżenie różnic parametrów uzyskanych dla komórek kontrolnych i komórek oddziałujących z NCD. Uzyskane wyniki wskazują na słabszy efekt stresu oksydacyjnego w komórkach odizolowanych od powierzchni metalicznych warstwą NCD. Można wnioskować, że modyfikacja powierzchni metalicznej, wykonana poprzez nałożenie warstwy nanokrystalicznego diamentu, podwyższa biogodność materiału.

## Podziękowania

*Badania przeprowadzono w ramach projektu badawczego KBN nr 1137/T08/2001/20*

## ZASTOSOWANIE BIOMATERIAŁÓW Z WARSTWAMI WĘGLOWYMI DO PRZEKŁUWANIA CIAŁA

BOCIĄGA D.\*, GRABARCZYK J.\*, NIEDZIELSKI P.\*, KRAKOS M.\*\*,  
MITURA K.\*

\* CENTRUM DOSKONAŁOŚCI NANODIAM,  
POLITECHNIKA ŁÓDZKA W ŁODZI, INSTYTUT INŻYNIERII MATERIAŁO-  
WEJ, ZAKŁAD INŻYNIERII BIOMEDYCZNEJ, POLSKA

\*\* UNIWERSYTET MEDYCZNY W ŁODZI,  
INSTYTUT PEDIATRII, POLSKA

**Słowa kluczowe:** warstwy węglowe, przekłuwanie ciała, "piercing", reakcja alergiczna, alergeny metali, biomateriały  
*[Inżynieria Biomateriałów, 43-44, (2005), 66-70]*

## Wprowadzenie

Przez ostatnich kilka lat ozdabianie ciała stało się bardzo popularne. Trudno jest przejść ulicą czy oglądać telewizję i nie natknąć się na osobę, która poddała się zabiegowi "piercingu". Czym jest dokładnie "piercing"? To przekłucie ciała, które następuje przy pomocy igły, po czym w miejsce to zakładana jest ozdoba (swego rodzaju biżuteria). Najbardziej popularnymi miejscami przekłuć są: uszy, usta, nozdrza, brwi, pępek, język, policzki, jak również miejsca intymne. Niewątpliwie więc przekłuwanie ciała związane jest z obecnością w organizmie różnego rodzaju swoistych "implantów", które są wykonywane z różnorodnych stopów

Poswig A, Krieg T, Scharffetter-Kochanek K: Adaptive antioxidant response protects dermal fibroblasts from UVA-induced phototoxicity. *Free Radic Biol Med* 2001; 30: 238-247.

[5] Ryhanen J, Niemi E, Serlo W, Niemela E, Sandvik P, Pernu H, Salo T: Biocompatibility of nickel-titanium shape memory metal and its corrosion behavior in human cell cultures. *J Biomed Mater Res* 1997; 35: 451-457.

[6] Morena M, Cristol JP, Senecal L, Leray-Moragues H, Krieter D, Canaud B: Oxidative stress in hemodialysis patients: is NADPH oxidase complex the culprit? *Kidney Int Suppl* 2002;80, 109-114.

[7] Mitura S, Mitura A, Niedzielski P, Couvrat P: Nanocrystalline Diamond Coatings. *J Chaos, Solitons and Fractals* 1999: 2165-2177.

[8] Jakubowski W, Bartosz G: 2,7-dichlorofluorescein oxidation and reactive oxygen species: what does it measure? *Cell Biol Int* 2000; 24: 757-760.

[9] Jakubowski W, Bilinski T, Bartosz G: Oxidative stress during aging of stationary cultures of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Free Radic Biol Med* 2000;28: 659-664.

[10] Akerboom TP, Sies H: Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol* 1981; 77: 373-382.

[11] Arbault S, Pantano P, Jankowski JA, Vuillaume M, Amatore C: Monitoring an oxidative stress mechanism at a single human fibroblast. *Anal Chem* 1995; 67:3382-3390.

[12] Grzegorz B: Metabolizm glutationu. *Postępy Biochemii* 1993;39: 32-38.

[13] Grzegorz B: *Druga twarz tlenu*. PWN, 1995.

## APPLICATION OF BIOMATERIALS WITH CARBON COATINGS FOR BODY PIERCING

BOCIĄGA D.\*; GRABARCZYK J.\*; NIEDZIELSKI P.\*; KRAKOS M.\*\*;  
MITURA K.\*

\* CENTER OF EXCELLENCE NANODIAM,  
TECHNICAL UNIVERSITY OF LODZ, INSTITUTE OF MATERIAL  
SCIENCE, BIOMEDICAL ENGINEERING DIVISION, POLAND

\*\* MEDICAL UNIVERSITY OF LODZ,  
INSTITUTE OF PEDIATRICS, POLAND

**Key words:** carbon coatings, body piercing, allergic reaction, metal allergens, biomaterials  
*[Engineering of Biomaterials, 43-44, (2005), 66-70]*

## Introduction

Over the past few years, body art has become popular, and it's hard to walk down the street or watch TV without seeing someone with piercing. A body piercing is exactly that - a piercing or puncture is made in the body by a needle. After that, a piece of jewelry is inserted into the puncture. The most popular pierced body parts seem to be the ears, lips, nostrils, eyebrows, belly buttons, tongues, or even cheeks and intimate organs. Therefore the body piercing is connected with the presence of various "implants" in human body, which currently are usually made from the various alloys. Besides of cosmetic and visual effects, the most important is the clinical results of this implantation. The many human disorders can be developing after the body piercing