

rzystano reakcję rezonansową  $^{12}\text{C}(p,p)^{12}\text{C}$ . W anali-  
zach tych zmieniano energię początkową bombardu-  
jącej wiązki protonów oraz kąt, pod jakim bombardo-  
wano analizowaną powłokę. Wszystkie analizowane  
powłoki charakteryzowały się złożoną strukturą z cien-  
ką amorficzną końcową warstwą i szeroką warstwą  
przejsiową do podłoża.

Do określenia mikrostruktury uformowanych powłok  
zastosowano również spektroskopię mikro - ramanow-  
ską oraz dyfrakcję promieniowania X.

[*Inżynieria Biomateriałów, 38-43, (2004), 199-200*]

## Podziękowania

Praca ta była częściowo finansowana z grantu KBN nr.  
4T08C 001 24.

# BIOMEDYCZNE SKUTKI KONTAKTU TKANKI Z IMPLANTEM

BOGDAN WALKOWIAK

ZAKŁAD BIOFIZYKI MOLEKULARNEJ I MEDYCZNEJ,  
UNIWERSYTET MEDYCZNY W ŁODZI

[*Inżynieria Biomateriałów, 38-43, (2004), 200-205*]

## Wstęp

Obecność implantu w ciele człowieka powoduje liczne, czę-  
sto nieprzewidywalne i niedoceniane skutki. Świadomość  
zagrożeń płynących z wprowadzenia obcego materiału do  
organizmu przyczyniła się do opracowania zbioru przepi-  
sów prawnych, zawartych w normie ISO 10993 [1], regulu-  
jących sposób postępowania z nowymi materiałami, i wy-  
konanymi z nich implantami, w celu dopuszczenia ich do  
zastosowań medycznych. Niestety, nawet bezwzględne  
przestrzeganie zaleceń zawartych w w/w normie nie zabez-  
piecza biorcy implantu przed komplikacjami. Powodem ta-  
kiej sytuacji jest duża różnorodność interakcji urządzenia  
medycznego z kontaktującą się z nim tkanką. Stwierdzenie  
to dotyczy głównie oddziaływań i skutków zachodzących  
na poziomie molekularnym w poszczególnych komórkach  
kontaktującej się tkanki, ale nie można mieć pewności, że  
w wyniku tego kontaktu nie pojawią się zmiany w funkcjo-  
nowaniu odległych tkanek. Przyczyną tego odległego efek-  
tu może być zarówno dyfuzja molekuł uwalnianych z po-  
wierzchni implantu jak i migracja komórek i biologicznie  
aktywnych makromolekuł, które doznały kontaktu z implan-  
tem. Co prawda istniejące normy przewidują badania w  
zakresie cytotoksyczności czy też kanceronogenezy, to jed-  
nak wymagane testy nie biorą pod uwagę obserwacji zja-  
wisk na poziomie molekularnym i niestety nie dają pełnej  
gwarancji bezpieczeństwa w zastosowaniu badanych urzą-  
dzeń medycznych do kontaktu z ciałem człowieka. Dla przy-  
kładu można przytoczyć materiały i produkty stosowane w  
dentystyce. Powszechnie stosowane do wykonania wypeł-  
nień i konstrukcji stomatologicznych stopy metali są przy-  
czyną powstawania ogniw galwanicznych o niewielkiej po-  
jemności energetycznej ale dużej zdolności regeneracyjnej  
[2]. Zjawiska elektrochemiczne zachodzące w obrębie jamy  
ustnej są często przyczyną patologicznych zmian, najczę-

methods are used.

[*Engineering of Biomaterials, 38-43, (2004), 199-200*]

## Acknowledgements

This work was carried out as part of research project:  
4T08C 001 24, financed by the Committee for Scientific  
Research (KBN).

# BIOMEDICAL EFFECT OF TISSUE CONTACT WITH AN IMPLANT

BOGDAN WALKOWIAK

DEPARTMENT OF MOLECULAR AND MEDICAL BIOPHYSICS,  
MEDICAL UNIVERSITY IN LODZ

[*Engineering of Biomaterials, 38-43, (2004), 200-205*]

## Introduction

A presence of an implant in the human body causes nu-  
merous, often no predictable and underestimated results.  
An awareness of hazard resulted from insertion of artificial  
material into the human body contributed to work up of a  
set of regulations, collected in ISO 10993 international stand-  
ard [1]), controlling the way of use of new materials and  
produced implants in medical applications. Unfortunately,  
even strictly realized recommendations of the above stand-  
ard do not protect an implant recipient from complications.  
A reason of such a situation results from a huge diversity of  
interactions of medical devices with directly surrounding tis-  
sues. This statement mainly concerns of interactions and  
effects taking place at a molecular level of individual cells of  
the tissue, but we should sure, that this contact do not cause  
changes in functioning of distant tissues. This faraway ef-  
fect can results from diffusion of molecules released from  
an implant surface, as well as from migration of cells and  
biologically active macromolecules, which were in contact  
with implant surface. However existing standards provide  
given examinations in cytotoxicity and carcinogenesis, but  
required tests do not take into account a molecular level of  
phenomena and do not guarantee entirely safe use of the  
examined medical devices in contact with the human body.  
As an example we can indicate materials and products be-  
ing in use in dentistry. Metal alloys, commonly used for dental  
fillings and restorations, are a reason of creation of galvanic  
elements possessing a low energetic capacity but a high  
regeneration ability [2]. Electrochemical phenomena taking  
place in the oral cavity are often a reason of pathological  
changes, most often leukoplakia [3], which usually subside  
with metal remove, but sometimes can also cause malign-  
ant changes [4]. There are very serious indications, that  
presence of galvanic elements can affect both, globally and

ściej leukoplakii (3), które zwykle ustępują po usunięciu metali, ale mogą być również bezpośrednią przyczyną rozwoju choroby nowotworowej w obrębie jamy ustnej (4). Istnieją bardzo poważne wskazania, że obecność ogniw galwanicznych może mieć wpływ nie tylko lokalny ale i ogólnoustrojowy (5). Pomimo bardzo długiego okresu czasu stosowania materiałów metalicznych w dentystyce, opisane problemy wcale nie zostały rozwiązane i do dziś stanowią poważne zagrożenie (6). Jak widać, nawet dla najczęściej i najdłużej stosowanych dentystycznych zabiegów wprowadzania implantów pojawiają się liczne komplikacje, których natura nie jest do końca rozpoznana.

Celem niniejszego doniesienia jest próba współczesnego spojrzenia na zagadnienie oddziaływania tkanek z implantami, z uwzględnieniem aktualnie dostępnych technik badawczych z zakresu biologii molekularnej, ale również z uwzględnieniem potencjalnych zagrożeń ze strony produktów nanotechnologii.

## Źródła zagrożeń

Jest oczywistym, że w przypadku materiałów metalicznych dochodzi do biokorozji, i w efekcie tego zjawiska, do pojawienia się w obrębie kontaktującej się z implantem tkanki jonów metali w dużej koncentracji. Nawet w przypadku odległych od siebie dwóch metalicznych implantów powstaje wtedy ogniwo galwaniczne. Dodatkowym jednak efektem jest możliwość toksycznego wpływu jonów metali na tkankę oraz pojawienia się reakcji alergicznej. Aby ograniczyć zjawisko korozji metalu proponuje się różnorodne modyfikacje powierzchni implantu. Wydaje się, że jest to bardzo obiecujący sposób postępowania, mogący znacznie poprawić biogodność materiałów metalicznych. Należy jednak zdać sobie sprawę z faktu, że w ten sposób wprowadza się do organizmu zupełnie nowy materiał, o odmiennych właściwościach powierzchniowych, mogący w nieoczekiwany sposób zmienić reakcję tkanek na nową molekularną strukturę powierzchni. Co więcej, nowa powierzchnia może być źródłem uwalniania molekuł innych niż jony metali i ich obecność w tkance powinna być brana pod uwagę. Zgodnie z normą ISO 10993 taki nowy materiał powinien zostać poddany ocenie biologicznej. Niezmiernie ważnym jest, aby wytworzona nowa powierzchnia trwale przylegała do materiału bazowego. Wszelkie powierzchniowe defekty materiałowe i lokalne delaminizacje warstwy całkowicie dyskwalifikują nowy produkt.

Inne biomateriały, włączając w to ceramiki, szkła, zole, materiały kompozytowe oraz materiały pochodzenia naturalnego, również ulegają stopniowej degradacji w środowisku płynów ustrojowych, stając się źródłem swobodnych substancji mogących stosunkowo łatwo migrować w całym organizmie, przyczyniając się do różnorodnych efektów biologicznych.

Często niedocenianym źródłem zagrożeń są mikroskopijnych rozmiarów pozostałości narzędzi chirurgicznych powstające w wyniku mechanicznego oddziaływania narzędzia z tkanką i z implantem lub ze zużycia implantu [7]. Źle dobrane materiały i złe wykonanie narzędzi oraz błędy operatora mogą być źródłem niespodziewanych reakcji alergicznych i zapalnych ale też mogą być przyczyną poważniejszych w skutkach efektów cytotoksycznych a nawet kancerogennych.

Zupełnie nową kategorię zagrożeń przynoszą produkty nanotechnologii [8, 9]. Z samego założenia rozmiary nanoobjektów i powierzchniowych nanostruktur są porównywalne z rozmiarami makrocząstek biologicznie aktywnych. Swobodne nanoobjekty mogą pokonywać różnorodne bariery we wnętrzu organizmu, włączając w to błony komór-

systemically (5). Despite of so long time of use of metallic materials in dentistry, the above described problems are not solved and till today are really dangerous (6). As we can see, even the most often and the longest time practiced dental procedures of implantation still bring numerous complications which nature still is not clear.

The aim of this report is an attempt of modern view on a problem of tissue-implant interaction, with respect to actually available techniques of molecular biology and with respect to potential risk generated by products of nanotechnology.

## Sources of risks

It is obvious, that metallic materials undergo biocorrosion, and it results in presence, in a high concentration, of metallic ions in tissues surrounding an implant. Even if metallic implants are in a considerable distance they build galvanic elements with all the consequences. Additionally a toxic effect of metallic ions and also allergic effect can appear. To limit a metal corrosion several surface modifications were proposed for implants. It seems to be a promising way, which might significantly improve biocompatibility of metallic materials. But it is necessary to realize that on this way we insert completely new material, into the recipient body, with different surface properties, able for unexpected manner change tissue response to a new surface molecular structure. Moreover, the new surface can release molecules distinct from metal ions, and their presence in a tissue should be considered. According to the ISO 10993 regulation, such a new material should undergo to biological estimation. It is essential that the new produced surface should durably stick to a base material. Any surface defects or local surface delamination entirely disqualify the new product.

Other materials, including ceramics, glasses, sols, composites or natural biomaterials, also undergo a gradual degradation, in contact with body fluids, releasing substances able to relatively freely migrate in a whole body causing variety of biological effects.

Microscopic size remains of surgical devices, created as a result of mechanical interaction of the device with tissue and with implant, and also particles produced by an implant wear, are often underestimated source of risk [7]. Wrongly selected materials and badly made devices combined with operator's mistakes can be a reason of unexpected allergic reactions and inflammables, but also can be a reason of much more serious cytotoxic and even malignant effects.

A completely new category of risk bring products of nanotechnology [8, 9]. A size of nanoobjects is comparable to a size of biologically active macromolecules. Free nanoobjects can pass through diverse barriers inside the human body, including cell membranes and intracellular membranes. It is well known a mimetic effect of synthetic products, obtained by a chemical synthesis (a kind of nanotechnology), possessing similar capability to cause biological effects as their natural equivalents [10, 11]. It is possible, that nanostructure randomly becomes a mimetic molecule of hormone or other regulatory biomolecule, and it can cause changes in a specific gene expression. It can lead to unexpectedly arise of diseases, including cancers, neurological diseases and even mental sicknesses.

Moreover, molecular structure of surface, or product of nanotechnology, unexpectedly can possess ability to induce conformational changes in proteins in similarity of prion proteins [12]. Such a process need not to cause a spongiform encephalopathy, as in prion disease, can cause other, to date not defined diseases. The above, rather speculative considerations, can not be supported today by any scien-

kowe i wewnątrzkomórkowe. Jest dobrze znany efekt mimetyczny produktów, uzyskanych drogą syntezy chemicznej (rodzaju nanotechnologii), posiadających podobną zdolność wywoływania efektów biologicznych jak ich naturalne odpowiedniki [10, 11]. Wystarczy aby nanostruktura przypadkowo stała się mimetykiem określonego hormonu, lub innej regulatorowej biomolekuły, a może być przyczyną zmian w ekspresji określonych genów. Może to być przyczyną nieoczekiwanych pojawiających się chorób, w tym chorób nowotworowych, neurologicznych a nawet psychicznych.

Co więcej, molekularna struktura powierzchni, lub produkt nanotechnologii, może nieoczekiwanie posiadać zdolność indukcji zmian konformacyjnych białek na podobieństwo białek prionowych [12]. Proces taki nie musi prowadzić do encefalopatii gąbczastej, jak w przypadku choroby prionowej, może być przyczyną innych, dotychczas nie zdefiniowanych schorzeń. Powyższe dość spekulatywne rozważania dziś jeszcze nie mogą być wsparte odpowiednimi wynikami badań naukowych z prostego powodu - dotychczas nikt takich badań nie prowadził.

Istnieją bardzo poważne poszlaki wskazujące na możliwość nieoczekiwanych efektów kontaktu tkanki z powierzchnią implantu. Dla przykładu hemodializa, zabieg ratujący życie chorym z przewlekłą niewydolnością nerek, choć normalizuje parametry biochemiczne krwi, staje się jednocześnie przyczyną daleko idących zmian w funkcjonowaniu płytek krwi. Hemodializowani chorzy w dalszym ciągu zagrożeni są skutkami skazy krwotocznej, której towarzyszą znaczące zmiany w profilu fosforylacji białek płytkowych, inne i bardziej drastyczne niż u chorych niedializowanych [13]. Można podejrzewać, że przyczyną tych zmian jest kontakt płytek krwi ze sztuczną powierzchnią membrany dializatora, który uzyskał wszystkie niezbędne atesty wymagane przez normę ISO 10993.

Nie bez znaczenia jest w końcu podatność powierzchni biomateriału na kolonizację przez drobnoustroje oportunistyczne [14]. Implanty usuwane z ciała biorcy, z powodu groźnych powikłań, zwykle zasiedlone są przez bakterie [15-17]. Zarówno częstość występowania powikłań jak i ich obecność w renomowanych klinikach sugeruje, że to nie błędy w procesie sterylizacji i przygotowaniu implantu do wszczepienia ale pooperacyjne zasiedlenie przez mikroorganizmy są sprawcą niepowodzenia. Oportunistyczne mikroorganizmy napotykając przyjazną sobie powierzchnię kolonizują ją i wytwarzają na niej struktury biofilmu, utrudniające dostęp komórek układu odpornościowego a nawet antybiotyków. Biofilm uwalnia toksyczne substancje bakteryjnej przemiany materii, a w sprzyjających sytuacjach uwalnia również bakterie stając się źródłem trudnych do likwidacji stanów zapalnych. Imobilizacja na powierzchni implantu substancji bakteriostatycznych znacząco redukuje liczbę powikłań [18, 19]. Jednak ograniczony czas życia antybiotyków w warunkach in vivo oraz uodparnianie się na nie szczepów bakteryjnych jest przyczyną ograniczającą to rozwiązanie.

Na zakończenie tych rozważań należy jednak dodać, że omawiane powyżej procesy stanowią nie tylko o zagrożeniu. Czasami są wysoce pożądane, szczególnie wtedy, gdy czas trwania kontaktu z biomateriałem jest ograniczony. Dla przykładu, w dentyście i chirurgii kostnej stosuje się biodegradowalne materiały stymulujące wzrost tkanki kostnej. Materiały takie z założenia powinny aktywować płytki krwi, prowadząc w ten sposób do uwalniania czynników wzrostu stymulujących wzrost tkanki kostnej [20]. Również odpowiednio wykonana struktura powierzchni może mieć pozytywny wpływ na integrację implantu z tkanką kostną, co zostało potwierdzone zmianami w ekspresji odpowiednich genów (21).

tific results due to simple reason - to date nobody did such a research.

There are quite serious circumstantial evidences indicating a possibility of unexpected effects of tissue contact with implant surface. For example hemodialysis, a lifesaving procedure for patients with renal failure, however normalize biochemical parameters of blood, is a reason of serious changes in blood platelets functioning. A risk of bleeding tendency still is present in hemodialyzed patients, and this tendency is associated with significant changes in profile of blood platelets proteins phosphorylation [13]. One can suspect, that these changes result from blood platelet contact with artificial surface of dialysis membrane, which has received all attests required by ISO 10993 standard.

Finally, not less important is susceptibility of biomaterial surface to opportunistic microbes colonization [14]. Implants removed from a recipient bodies, due to dangerous complications, are usually settled by bacteria [15-17]. Both, frequency of complications and their presence in famous clinics suggest, that neither inadequate sterilization nor wrong preparation of implant, but post surgery microbial colonization of implant surface is responsible for surgery failure. Opportunistic microbes finding friendly surface colonize it and produce structure of biofilm, which makes difficult an access of immune cells and even antibiotics. A biofilm releases toxic substances of bacterial metabolism, and in a favorable situation it releases also bacteria causing inflammations difficult for treatment. An immobilization of antibiotics at an implant surface significantly reduced a number of complications [18, 19]. But limited in vivo lifetime of antibiotics and bacterial strain immune are limitations of this solution.

Finishing this consideration we have to state that above discussed processed, however risky for the body, sometimes are highly desirable, especially when contact time of medical device with the body is limited. For example, in bone surgery and in dentistry are used biodegradable materials stimulating growth of bone tissue. Such the materials, in assumption, should activate blood platelets causing a release of growth factors, stimulating bone tissue growth [20]. Also properly prepared structure of implant surface can positively affect implant integration with a bone tissue. It was confirmed by changes in specific genes expression [21].

## Transcriptomics and proteomics in service of material engineering and nanotechnology

Risk sources, discussed above, have to be effectively monitored and defined. Currently being in force ISO 10993 standard does not include inspection of molecular processes affecting gene expression and related effects. The author of this report applied twice to 6 FP of European Commission, as a coordinator, for financial support for realization of project concerning of monitoring of risk connected to presence of new products of nanotechnology and materials engineering. Projects with acronyms NANORISK [22] and NANORISKA [23], were based on adaptation of well functioning in molecular biology techniques of proteomics and transcriptomics. Both projects, assessed as a good, were not qualified for financial support. But there is a very urgent need to organize in Poland a research center focusing interest on study of potential risk and also potential benefits resulting from possibility to affect specific genes expression. At present we can find very first reports describing the use of microarray technique for study of changes in expression of genes responsible for: signal transduction, transla-



## Transkryptomika i proteomika na usługach inżynierii materiałowej i nanotechnologii

Omówione powyżej źródła zagrożeń dla organizmu biorcy muszą być skutecznie monitorowane i definiowane. Obecnie obowiązująca w tym zakresie norma ISO 10993 nie obejmuje nadzoru molekularnych procesów wpływających na ekspresję genów i wynikające stąd skutki. Autor opracowania dwukrotnie, w 2003 i 2004 roku, zgłaszał jako koordynator, w ramach 6 PR Unii Europejskiej, projekt dotyczący monitorowania zagrożeń związanych z powstawaniem nowych produktów nanotechnologii oraz inżynierii materiałowej. Projekty te, o akronimach NANORISK [22] i NANORISKA [23], oparte zostały na propozycji zastosowania technik dobrze funkcjonujących dla potrzeb proteomiki oraz transkryptomiki. Oba projekty, ocenione jako dobre, nie zostały zakwalifikowane do finansowania. Istnieje bardzo pilna potrzeba zorganizowania w Polsce centrum badawczego skupiającego swoje siły na badaniu potencjalnych zagrożeń, ale też potencjalnych korzyści wynikających z możliwości wpływania na ekspresję określonych genów. Już teraz pojawiają się doniesienia opisujące zastosowanie techniki mikromacierzy do badania zmian w ekspresji genów biorących udział w procesach: transdukcji sygnału, translacji, regulacji cykli komórkowych, regulacji funkcji metabolicznych i strukturalnych oraz apoptozy w komórkach osteoblastów kontaktujących się powierzchniami o zróżnicowanej topografii [24]. Podobnie pojawiają się pierwsze doniesienia o zastosowaniu proteomiki do oceny wpływu kontaktu biomateriału z komórkami na funkcje wybranych białek receptorowych [25]. Trudno przecenić wagę zagrożeń i korzyści płynących z modulacji ekspresji genów i ich produktów - białek, a możliwość monitorowania tych zmian staje się zagadnieniem pierwszoplanowym dla nowoczesnych technologii materiałowych i nanotechnologii.

## Nowe możliwości badawcze i diagnostyczne

Osiągnięcia technik badawczych biologii molekularnej umożliwiają śledzenie zmian w ekspresji poszczególnych genów w odpowiedzi na sygnały pochodzące z otoczenia komórki. Klasyczna już technika PCR (łańcuchowa reakcja polimerazy), pozwala na selektywne namnożenie wybranego fragmentu DNA, czy wykonanie kopii mRNA w postaci cDNA. Technika ta wykorzystuje termostabilną (odporną na wysokie temperatury) polimerazę DNA (lub odwrotną transkryptazę RNA), która na bazie matrycy jednoniciowego DNA (mRNA), syntetyzuje komplementarną nić DNA. Proces syntezy rozpoczyna się od miejsca wskazanego przez starter - krótki, syntetyczny fragment polinukleotydu o sekwencji komplementarnej do wybranego regionu DNA (mRNA), i powtarza się cyklicznie zawierając proces termicznej denaturacji dwuniciowej formy, hybrydyzację startera z cząsteczką matrycową oraz proces wydłużania komplementarnej nici przez polimerazę. Teoretycznie, w każdym cyklu liczba nowo syntetyzowanych nici podwaja się. Stosując technikę PCR można ze śladowej ilości materiału wyjściowego uzyskać niemal dowolnie dużo identycznych kopii wyjściowej matrycy. Technika Real Time PCR (RT-PCR) jest techniką pochodną, wykorzystującą dodatkowo fluorescencyjne znakowanie produktów PCR. W ten sposób w trakcie trwania procesu można śledzić intensyw-

tion, cell cycle regulation, cell metabolism and structure regulation and also apoptosis regulation, in osteoblast-like cells interacting with surface with distinct topography (24). Also first reports of use of proteomics approach for estimation of affect of biomaterial contact with cells are available (25). It is difficult to overestimate risks and benefits resulting from modulation of gene expression and their products - proteins, and monitoring of these effects becomes a crucial issue for modern material technologies and nanotechnologies.

## New research and diagnostic capabilities

Achievements of research techniques in molecular biology make possible to monitor changes in expression of individual genes in response to signals coming from a cell environment. Already classical PCR (Polymerase Chain Reaction) technique allows for selective amplification of selected DNA fragment, or make and amplify copy of mRNA in a form of cDNA. This technique uses thermostable (resistant to a high temperature) DNA-polymerase (or reverse mRNA-transcriptase) which synthesizes complementary strand of DNA on the base of a single strand DNA (mRNA) template. The synthesis process begins from the site indicated by a primer - short, synthetic polynucleotide fragment with a sequence complementary to the selected region of DNA (mRNA), and is repeated in a cycle consisting of thermal denaturation of a double stranded form, primer hybridization to a template molecule, and an elongation of a complementary strand by a polymerase. A number of template molecules is doubled in each separate cycle. PCR technique allows to obtain almost unlimited number of identical template copies starting from a trace amount. Real Time PCR (RT-PCR) technique is a derivative technique, taking advantage of fluorescently labeled PCR products. On this way, it is possible to monitor, in a real time, an intensity of fluorescence and exactly estimate a number of created copies, or a cycle number giving fluorescence signal significantly different from a baseline. It means, this technique allows to estimate quantitatively an initial amount of template molecules. It is also possible to monitor simultaneously several distinct processes using multicolor labeling. The last solution allows to easily estimate differences in initial amount of specific mRNA templates, and as a result estimate a relative change in a specific gene expression. Transcriptomics is a part of molecular biology doing an estimation of genes expression by monitoring of information transcription from DNA to mRNA. A microarray technology, designed especially for transcriptomics, allows to analyze simultaneously an expression of several thousands genes. A microarray is a chip with intentionally prepared surface containing immobilized fragments of DNA or mRNA, in a dot format, representing specific genes. It is a kind of molecular library representing separate genes. A high density printing technology allows to place at a chip surface information about several thousands genes per a few square centimeters. PCR technique is used for production of fluorescently labeled cDNA probes representing a total amount of cellular mRNA. A contact of labeled probes with a microarray results in a specific probes hybridization to appropriate fragments of genes, and informs us about expression of specific genes. A quantitative information about a specific gene expression can be read from an intensity of fluorescence, which is related to hybridization intensity, Proteomics is a part of molecular biology doing an estimation of gene expression products - proteins. It turned out that not every expression of interested gene results in pro-

ność fluorescencji i dokładnie ilościowo oznaczyć ilość powstałych kopii lub numer cyklu od którego intensywność fluorescencji jest wyraźnie wyższa od wartości bazowej. Inaczej mówiąc, jest to technika pozwalająca na ilościowe oznaczenie wyjściowej liczby cząsteczek matrycy. Zastosowanie wielobarwnego znakowania fluorescencyjnego pozwala na jednoczesne śledzenie kilku procesów zachodzących w tym samym czasie. Pozwala więc na ocenę różnic w wyjściowej ilości określonego mRNA, a tym samym na ocenę względnej zmiany ekspresji określonego genu. Transkryptomika to ta część biologii molekularnej, która zajmuje się oceną ekspresji genów poprzez śledzenie procesu transkrypcji informacji z DNA na RNA. Pracującą na rzecz transkryptomiki technika mikromacierzy pozwala na jednoczesną analizę ekspresji wielu tysięcy genów. Mikromacierz to nośnik na powierzchni którego naniesiono i trwale związane, w postaci niewielkich, niemal punktowych obszarów, fragmenty DNA lub mRNA reprezentujące określone geny. Powstaje w ten sposób biblioteka molekularna reprezentująca te geny. Przy odpowiedniej gęstości nanoszonych kropek, na powierzchni kilku centymetrów kwadratu można umieścić informację o wielu tysiącach genów. Wykorzystując technikę PCR można z wyjściowego materiału, zawierającego całkowity mRNA komórki, wykonać fluorescencyjnie znakowane kopie cDNA zwane sondami. Kontakt tak przygotowanych sond z mikromacierzą skutkuje specyficzną hybrydyzacją sondy z unieruchomionym fragmentem genu, informując, że w wyjściowym materiale obecne były cząsteczki mRNA powstałe w wyniku ekspresji tego genu. Intensywność hybrydyzacji, odczytywana z intensywności fluorescencji, informuje jednocześnie w sposób ilościowy o ekspresji tego genu.

Proteomika jest częścią biologii molekularnej zajmującą się badaniem produktów ekspresji genów - białek. Okazało się, że nie każda ekspresja genu skutkuje oczekiwaną produkcją aktywnej formy białka. Co więcej, na nici DNA znajduje się informacja o liniowej sekwencji aminokwasów w peptydzie, a aktywna biologicznie cząsteczka białka składa się zwykle z wielu peptydów (podjednostek) i poddana jest licznym posttranslacyjnym modyfikacjom. Wszystkie procesy, zarówno sama synteza nowych polipeptydów, jak i ich składowanie, nadanie odpowiedniej struktury przestrzennej, oraz dołączanie grup cukrowych i fosfolipidowych nadzorowane są przez inne cząsteczki białkowe. Poznanie pełnej współzależności cząsteczek białkowych jest niezbędne dla wyjaśnienia i przewidywania funkcjonowania komórki. Proteomika bazuje na dwukierunkowej elektroforezie białek. Pierwszy kierunek rozdziału odbywa się zgodnie z wartościami pI, a drugi zgodnie z masami cząsteczkowymi białek. W tak uzyskanej dwuwymiarowej mapie wielu tysięcy białek poszukuje się tych cząsteczek, których ilość uległa zmianie (zmiana w ekspresji białek) w wyniku zadziałania kontrolowanego czynnika zewnętrznego. Białko to, pobrane z żelu elektroforetycznego, poddawane jest następnie identyfikacji przy pomocy spektrometrii masowej. Z dnia na dzień przybywa informacji o identyfikacji nowych białek i określeniu współdziałania i interakcji z innymi białkami. Proteomika wykorzystuje też techniki mikromacierzy do szybkiego, przesiewowego badania funkcjonalnych właściwości znanych białek.

duction of an active form of protein. Moreover, DNA contains information about a linear sequence of amino acids in a peptide, but biologically active protein molecule usually consists of several peptides (subunits) and undergo to numerous posttranslational modifications. All processes, including synthesis of new polypeptides, their assembly and folding, and also incorporation of carbohydrate and phospholipid groups are managed by other proteins. Recognition of mutual relations between protein molecules is necessary for explanation and prediction of cell functioning. Proteomics bases on two dimensional (2D) electrophoresis of proteins. The first direction of separation is made in respect to pI values, whereas the second one is made according to molecular mass of proteins. This way obtained two dimensional map of several thousands of proteins allows to look for molecules appearing in a higher or lower amount, due to the cell interaction with a controlled external factor. The found protein, taken up from an electrophoretic gel, is subjected to mass spectrometry for identification. Almost every day brings new information about identification of new protein and proteins cooperation and interaction. Proteomics utilizes also microarray technique for fast screening of functional properties of known proteins.

- [1] ISO 10993, Biological evaluation of medical devices. The International Organization for Standardization 1999
- [2] Dzieńkowski T., Jatczak J., Jędrzejewski T., Walkowiak B. Measurements of the power of electric current generated on a resistor containing an electric pile developed in patients with amalgam fillings. *Czas Stomat.* 1980; 33: 905-12.
- [3] Perfetti G., Maggiore C., Isidori F. A case of leukoplakia from bimetallism in a single tooth. *Attual Dent.* 1988; 4: 36-8.
- [4] Ishii J., Fujita K., Munemoto S., Komori T. Management of oral leukoplakia by laser surgery: relation between recurrence and malignant transformation and clinicopathological features. *J. Clin. Laser Med. Surg.* 2004; 22: 27-33.
- [5] Bergman M. Corrosion in the oral cavity - potential local and systemic effects. *Int. Dent. J.* 1986; 36: 41-4.
- [6] Schmalz G., Garhammer P. Biological interactions of dental cast alloys with oral tissues. *Dent. Mater.* 2002; 18: 396-406.
- [7] Yagil-Kelmer E., Kazmier P., Rahaman MN., Bal BS., Tessman RK., Estes DM. Comparison of the response of primary human blood monocytes and the U937 human monocytic cell line to two different sizes of alumina ceramic particles. *J. Orthop. Res.* 2004; 22: 832-8.
- [8] The role of nano-particles in biomaterial-induced pathologies. Project supported by EC, No. QLK4-CT-2001-00147
- [9] Risk assessment in production and use of nano-particles with development of preventive measures and practice codes. Project supported by EC, No. G1MA-CT-2002-00020.
- [10] Gardiner J., Abell A.D. Synthesis and solid state conformation of phenylalanine mimetics constrained in a proline-like conformation. *Org. Biomol. Chem.* 2004; 2(16): 2365-70.
- [11] Lutolf M.P., Weber F.E., Schmoekel H.G., Schense J.C., Kohler T., Muller R., Hubbel J.A. Repair of bone defects using synthetic mimetics of collagenous extracellular matrices. *Nat Biotechnol.* 2003 21(5): 513-8.
- [12] Aguzzi A., Heikenwalder M., Miele G. Progress and problems in biology, diagnosis and therapeutics of prion diseases. *J Clin Invest.* 2004; 114: 153-160.
- [13] Walkowiak B., Tanski W., Koziółkiewicz W. Phosphorylation of platelet protein in hemodialysed patients is different than in control donors. XIX Congress on Thrombosis and Haemostasis, Birmingham, UK. July 2003, abstract No. P1315.
- [14] Jakubowski W., Bartosz G., Niedzielski P., Szymanski W., Walkowiak B. Nanocrystalline diamond surface is resistant to bacterial colonization. *Diamond and Related Materials*, 2004; 10: 1761-3.
- [15] Marrie T.J., Nelligan J., Costerton J.W. A scanning and transmission electron microscopic study of an infected endocardial pacemaker lead. *Circulation*, 1982; 66: 1339-41.
- [16] Leunisse C., van Weissenbruch R., Busscher HJ., van der Meri HC., Dijk F., Albers FW. Biofilm formation and design features of indwelling silicone rubber tracheoesophageal voice prostheses--an electron microscopical study. *J Biomed Mater Res.* 2001; 58: 556-563.
- [17] Zucchelli G., Cesari C., Clauser C., DeSanctis M. Early bacterial accumulation on guided tissue regeneration membrane materials. An in vivo study. *J Periodontol.* 1998; 69: 1193-202.
- [18] Zucchelli G., Sforza N.M., Clauser C., Cesari C., DeSanctis M. Topical and systemic antimicrobial therapy in guided tissue regeneration. *J Periodontol.* 1999; 70: 239-47.
- [19] Hendricks SK., Kwok C., Shen M., Horbett T.A., Ratner B.D., Breyers J.D. Plasma-deposited membranes for controlled release of antibiotic to prevent bacterial adhesion and biofilm formation. *J Biomed Mater Res.* 2000; 50: 160-70.
- [20] Kozakiewicz M., Okrój W., Klimek L., Łobos M., Walkowiak B. Bone substitute material and barrier membrane interaction with human blood platelets. 10th Erfurt Conference on Platelets. Erfurt, Germany, June 2004. Abstract book, page 71.
- [21] Schneider GB., Perinpanayagam H., Clegg M., Zaharias R., Seabold D., Keller J., Stanford C. Implant surface roughness affects osteoblast gene expression. *J. Dent. Res.* 2003; 82: 372-6.
- [22] Consequences of nanotechnology progression and use in medicine - estimation by genomics and proteomics approach. Proposal with acronym NANORISK, FP6-2003-NEST-A/2507.
- [23] Consequences of nanotechnology progression and use in medicine - estimation by genomics and proteomics approach. Proposal with acronym NANORISKA, FP6-2004-NEST-B-2/12895.
- [24] Carinci F., Pezzetti F., Volinia S., Francioso F., Arcelli D., Marchesini J., Scapoli L., Piattelli A. Analysis of osteoblast-like MG63 cells' response to a rough implant surface by means of DNA microarray. *J. Oral. Implantol.* 2003; 29: 215-20.
- [25] Ndimba B.K., Chivasa S., Hamilton J.M., Simon W.J., Slabas AR. Proteomic analysis of changes in extracellular matrix of Arabidopsis cell suspension cultures induced by fungal elicitors. *Proteomics*, 2003; 3: 1047-59.