

NANOKRYSTALICZNY DIAMENT (NCD) – NOWY I OBIECUJĄCY MATERIAŁ DO ZASTOSOWAŃ MEDYCZNYCH

BOGDAN WALKOWIAK^{*,**}, WIESŁAWA OKROJ^{*},
IWONA PRZYBYSZEWSKA^{*}, MARTA PIREK^{*}, WITOLD SZYMANSKI^{*},
PAWEŁ KOŚĘDA^{*}, WITOLD JAKUBOWSKI^{*}

*INSTYTUT INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ,
POLITECHNIKA ŁÓDZKA

**ZAKŁAD BIOFIZYKI MOLEKULARNEJ I MEDYCZNEJ,
UNIwersytet Medyczny w Łodzi

Streszczenie

Nanokrystaliczny diament (NCD) przejawia szereg interesujących właściwości. Niektóre z nich mogą być atrakcyjne w zastosowaniach biomedycznych. Niniejsze opracowanie dotyczy badań nad anty-oksydacyjnymi właściwościami NCD, jego trombocytopennością oraz odpornością na powstawanie biofilmu. Badania realizowano stosując następujące metody:

1. Obserwacja luminolowo-zależnej luminescencji, wywoływanej przez reaktywną formę tlenu (kwas podchlorawy) generowaną przez chloraminę T w osoczu krwi, w obecności proszków diamentowych. Intensywność mierzonej luminescencji jest wprost proporcjonalna do ilości reaktywnych form tlenu w badanym układzie. Stwierdzono, że obecność proszków diamentowych znamienne i w sposób zależny od ich koncentracji wpływała na obniżenie ilości kwasu podchlorawego.

2. Obserwacja adhezji płytek krwi do badanych powierzchni z użyciem skaningowego mikroskopu elektronowego. Wykazano, że płytki krwi tylko w niewielkiej ilości, w porównaniu z powierzchnią stali medycznej, przylegały do powierzchni NCD. Jednak skazy powierzchni NCD były miejscem intensywnej adhezji płytek krwi.

3. Obserwacja zasiedlenia badanych powierzchni przez komórki *E.coli*, z zastosowaniem mikroskopu fluorescencyjnego. Pokazano, że bakterie najchętniej kolonizowały powierzchnię stali medycznej 316L. Znacznie słabiej powierzchnię stopu tytanu Ti6Al4V. Najbardziej oporna na kolonizację komórkami *E.coli* była powierzchnia NCD. Uzyskane wyniki wskazują również na wzrost podatności na kolonizację przez mikroby powierzchni opłaszczanej białkami.

Wstęp

Powierzchnia implantu kontaktująca się z płynami ustrojowymi jest miejscem wielu ważnych i często nie do końca poznanych procesów. Dla przykładu, korozja metalu prowadzi do gromadzenia się jonów metalu w otaczającej tkance, co czasami może być wysoce toksyczne. Z drugiej strony korozja może przyczynić się do utraty mechanicznych właściwości implantu. Niepożądane odkładanie się białek oraz adhezja komórek do powierzchni implantu przeznaczonego do kontaktu z krwią może prowadzić do stopnio-

NANOCRYSTALLINE DIAMOND (NCD) – A NEW AND PROMISING MATERIAL FOR MEDICAL APPLICATIONS

BOGDAN WALKOWIAK^{*,**}, WIESŁAWA OKROJ^{*},
IWONA PRZYBYSZEWSKA^{*}, MARTA PIREK^{*}, WITOLD SZYMANSKI^{*},
PAWEŁ KOŚĘDA^{*}, WITOLD JAKUBOWSKI^{*}

*INSTITUTE OF MATERIAL SCIENCES AND ENGINEERING,
TECHNICAL UNIVERSITY OF LODZ, POLAND

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

Abstract

Nanocrystalline diamond (NCD) exhibits several interesting properties. Some of them can be attractive in biomedical applications. This study concerns of research on anti-oxidative properties of NCD, its thrombocytopenicity, as well as its resistance to bacterial biofilm formation. Results were obtained using following methods:

1. Observation of luminol-depend luminescence caused by reactive oxygen species (hypochlorous acid) generated by chloramine T in blood plasma, in the presence of diamond powders. The intensity of measured luminescence is directly proportional to the amount of reactive oxygen species in the system. We have found, that presence of diamond powder particles (DPP) significantly and concentration-dependently causes decrease in hypochlorous acid amount.

2. Observation of platelets adhesion to examined surface with use of scanning electron microscopy (SEM). It was proved, that blood platelets adhered to NCD surface only in a very small amount when compared to medical steel surface. However, defects of the NCD surface were the place of intensive platelet adhesion.

3. Observation of colonization of examined surfaces by *E.coli* cells, was performed with use of fluorescence microscope. It was shown that bacteria colonized predominantly medical steel 316 L surface whereas titanium alloy Ti6Al4V surface was colonized considerably less. NCD surface was the most resistant to *E.coli* cells colonization. The received results also point higher susceptibility to microbial colonization of surface coated by proteins.

Key words: nanocrystalline diamond, diamond powders, reactive oxygen species, antioxidant, platelet adhesion, microbial colonization, biofilm

Introduction

An implant surface allowed for contact with body fluids is a place of numerous important but often underestimated processes. For example, a metal corrosion leads to deposition of the metal ions in the surrounding tissue, and it sometimes can be extremely toxic. On the other hand, corrosion can cause loss of mechanical features of implant. Deposition of proteins and cell adhesion to the implant surface, predicted for contact with blood, is unwelcome and

wego ograniczania jego roli aż do całkowitej utraty jego funkcji. Podatność powierzchni implantu na kolonizację przez mikroorganizmy jest wysoce niepożądana i może być przyczyną groźnych infekcji. Nawet bardzo starannie przygotowana i sterylna powierzchnia implantu, jeżeli jest przyjazna dla mikroorganizmów, może być przez nie skolonizowana. Ukryte w warstwie biofilmu oportunistyczne mikroorganizmy mogą być nieosiągalne dla układu immunologicznego i mogą stać się odporne na środki farmakologiczne stanowiąc jednocześnie źródło toksycznych substancji i potencjalne zagrożenie maszyną infekcją. Powszechnie uważane jako najbardziej biogodne są materiały wytwarzane na bazie stopów tytanu oraz materiały ceramiczne. Jednak i one nie są wolne od wad. Wydaje się, że powierzchniowe modyfikowanie materiałów metalicznych może dostarczyć materiałów wysoce biogodnych, dobrze tolerowanych przez organizm biorcy oraz wykazujących te cechy, które są odpowiednie dla danej grupy implantów. Ostatnio uwaga nasza skupiona była na badaniu warstw nanokrystalicznego diamentu (NCD) zsyntetyzowanych na powierzchniach metali. Warstwa NCD wytwarzana była w reaktorze próżniowym metodą RF CVD. Metoda ta (1) jest obecnie stosowana do modyfikacji powierzchni metali. Analiza strukturalna i chemiczna warstw węglowych wytworzonych tą metodą pokazuje obecność warstwy nanokrystalicznego diamentu (96% czystego diamentu) a pozostałą część stanowią alotropowe formy węgla. Warstwa NCD wykazuje bardzo obiecujące własności mechaniczne i jest dobrze tolerowana przez organizm biorcy (2), wykazuje pozytywne cechy w kontakcie z krwią (3) dodatkowo ukazując swe antyoksydacyjne właściwości (4). Prezentowane poniżej wyniki ukazują oporność warstwy NCD na adhezję płytek krwi oraz na kolonizację mikrobiologiczną. Potwierdzają również wcześniej opisane działanie antyoksydacyjne (4).

Materiały i metody

Materiał biologiczny

Krew pobierano od zdrowych dawców, nie przyjmujących w okresie co najmniej dwóch tygodni przed badaniem żadnych leków. Wszyscy dawcy byli poinformowani o celach prowadzonych badań i wyrazili zgodę na oddanie krwi. Jako antykoagulantu użyto cytrynianu sodowego w końcowym stężeniu 3,8%. Osocze ubogopłytkowe uzyskiwano z krwi cytrynianowej poprzez wirowanie 1000xg, 10 minut w temperaturze pokojowej. Uzyskane osocze było porcjowane i przechowywane w temperaturze -70°C. Aby ograniczyć przypadkowe straty fibrynogenu, osocze rozmrażane było przed użyciem w temp. 37°C, bez mieszania. Komórki bakteryjne *E. coli* (szczep K12) pochodziły z Instytutu Biologii Molekularnej Uniwersytetu Łódzkiego.

Odczynniki chemiczne

Wszystkie odczynniki chemiczne zastosowane w badaniach kupiono od firmy SIGMA-ALDRICH.

Proszki diamentowe

Proszki diamentowe uzyskane zostały w Zakładzie Inżynierii Biomedycznej Wydziału Mechanicznego PŁ podczas procesu wytwarzania nanokrystalicznych warstw diamentowych metodą RF PCVD.

Przygotowanie próbek

Próbki w kształcie krążków o średnicy 8 mm i grubości 2 mm wykonane zostały ze stali medycznej (316L) i stopu tytanu (Ti6Al4V). Przygotowane zostały przez obróbkę skrawaniem (toczenie), następnie polerowane mechanicznie i elektrochemicznie. Na niektóre próbki wykonane ze stali medycznej naniesiono warstwę NCD wykorzystując meto-

can lead to a gradual reduction of the implant function, up to a total loss of an expected benefits. A susceptibility of an implant surface to bacterial colonization is essentially unwelcome and can be a reason of dangerous infections. Even very carefully prepared and sterilized implant surface, if friendly for microbes, can be colonized by them. The opportunistic microbes, hidden in a biofilm layer, can be not attained for immunological system and can also be resistant to pharmacological agents. It becomes a source of toxic substances and make a potential risk of massive infection. Titanium alloys and ceramic materials are generally accepted as the most biocompatible. However, they are not free from faults. It seems, that modified metallic surface can give us highly biocompatible materials, well tolerated by a recipient body, and wearing properties suitable for given implant. Our recent effort was focused on examination of nanocrystalline diamond (NCD) layers synthesized on a metal surfaces. NCD layer was formed in a vacuum reactor chamber by a radio frequency plasma activated chemical vapor decomposition (RF PCVD) method (1). Structural and chemical analysis of carbon coating, produced by this method, revealed the presence of nanocrystalline diamond (96% pure diamond), apart from other allotropic carbon forms. NCD coating exhibits very promising mechanical features and is very well tolerated by a recipient body (2), exhibits positive features in contact with blood (3), and additionally showing its anti-oxidative properties (4). The results presented below show resistance of NCD surface to platelet adhesion and microbial colonization, and also proved earlier described anti-oxidative properties (4).

Materials and methods

Biological material

Blood was taken from healthy donors, who had abstained from any medicines for at least two weeks before the examination. All donors were informed about aims of conducted research and gave assent for blood collection. Sodium citrate was used as an anticoagulant in final concentration 3,8 %. Platelet poor plasma (PPP) was obtained from citrated blood by centrifugation at 1000xg, for 10 minutes at room temperature. The PPP was portioned and stored at -74°C, in order to reduce an accidental loss of fibrinogen, plasma was defrozen at 37°C just before its use. *E. coli* cells (strain K12) were from Department of Molecular Biophysics, University of Lodz.

Chemical reagents

All chemical reagents, used in this research, were purchased from SIGMA-ALDRICH.

Diamond powders

Diamond powders (DPP) were obtained in the Institute of Biomedical Engineering, Mechanical Department, Technical University of Lodz, during production of nanocrystalline diamond layer by RF PCVD method.

Sample preparation

Samples, disc-shape of 8 mm diameter and of 2 mm thickness, were made of stainless steel 316 L or titanium alloy Ti6Al4V. The discs were prepared using machining procedures. Stainless steel samples were then mechanically and electrochemically polished. Same samples made of medical steel were subjected with NCD by RF PCVD method.

Effect of DPP presence on blood plasma luminescence

Diamond powder suspension was prepared for 24 hours before the experiment. The powder was suspended in PBS buffer (140 mM NaCl in 0.2 M phosphate buffer, pH 7.4), in

dę RF CVPD.

Efekt obecności proszków diamentowych na luminescencję osocza

Na 24 godziny przed doświadczeniem przygotowano zawiesinę proszku diamentowego w buforze PBS (140 mM NaCl w 0,2 M buforze fosforanowym, pH 7,4), w ilości 1 g proszku na 1 ml buforu.

Badania przeprowadzono w 96 studzienkowej płaskodennej mikropłytkce (NUNCK). Do studzienek dodawano: 25 μ l ubogopłytkowego osocza krwi, 10 μ l chloraminy T (4 mM) oraz odpowiednią ilość proszku diamentowego: 0, 0,001, 0,025, 0,5, 0,1 mg. Całość uzupełniano do objętości 210 μ l buforem PBS. Bezpośrednio przed rozpoczęciem pomiaru dodawano 20 μ l luminolu. Dodatkowo wykonywane były dwie kontrole nie zawierające proszku diamentowego. Ponadto kontrola I nie zawierała chloraminy T, a kontrola druga nie zawierała osocza. Pomiaru intensywności luminescencji dokonywano co 3 minuty, w temperaturze 37°C, w czasie 20 minut, korzystając z wielofunkcyjnego czytnika mikropłytek VICTOR 1420 (WALLAC) w Zakładzie Biofizyki Molekularnej i Medycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Każdy badany proszek analizowany był w trzech powtórzeniach.

Ocena podatności powierzchni na adhezję płytek krwi

Próbki wykonane ze stali medycznej, oraz te pokryte warstwą NCD, preinkubowane były w obecności osocza ubogopłytkowego przez 12 godzin w 4°C. Następnie były dokładnie płukane w buforze PBS i poddane kontaktowi z cytrynianową krwią ludzką w ciągu 1 godziny. W tym czasie próbki były delikatnie mieszane. Każda próbka inkubowana była osobno. Po zakończeniu inkubacji próbki dokładnie obmywano PBS-em a następnie utrwalano w 3% glutaraldehydzie (w PBS) w czasie 1 godziny w temp. 4°C. Utrwalone próbki odwadniane były w rosnącym stężeniu etanolu i suszone w strumieniu powietrza. W końcowym etapie preparatyki próbki pokryto 20 nm warstwą złota (w napylarce JEE - 4 X Jeol). Do analizy powierzchni próbek zastosowano skaningowy mikroskop elektronowy HITACHI S - 3000N, będący własnością Instytutu Inżynierii Materiałowej Politechniki Łódzkiej. Obserwacje prowadzono przy napięciu 5 kV. Uzyskane obrazy gromadzone były w pamięci komputera w celu ich porównawczej analizy.

Ocena oporności powierzchni na kolonizację przez komórki *E.coli*

Każda z próbek umieszczona została w oddzielnym pojemniku i zanurzona w pożywce o składzie: NaCl (1%), baktepepton (1%), ekstrakt drożdżowy (0,5%), pH7,0. Do pożywki dodano komórki *E.coli* ($2 \cdot 10^3$ /ml) i prowadzono hodowlę przez 3 dni w temp 28°C, z delikatnym mieszanem. W odrębnej części eksperymentu próbki były poddane działaniu roztworu albuminy wołowej (BSA) (10 mg/ml) lub osocza krwi ubogo płytkowego (PPP) w czasie 24 godzin. Po przemyciu wodą destylowaną próbki te traktowano jak powyżej. Po ukończeniu hodowli próbki były dokładnie przemywane wodą destylowaną i poddane znakowaniu fluorescencyjnemu. Na powierzchnię każdej z próbek наносono 20ml roztworu znacznika bis-benzidiny (100 μ g/ml) i pozwolono na jego wniknięcie do wnętrza komórek (10 min. 28°C) chroniąc próbki od światła. Znacznik we wnętrzu komórek wiązał się z dwuniciową formą DNA i tylko w tej formie był fluorescencyjnie aktywny. Fluorescencyjnie znakowane próbki poddano obserwacji przy pomocy fluorescencyjnego mikroskopu TE 200 (Nikon) w Instytucie Biofizyki Uniwersytetu Łódzkiego w Łodzi. Obrazy fluorescencyjne rejestrowane były przy pomocy cyfrowego aparatu fotograficznego a następnie analizowane w celu określenia liczby komórek *E.coli* zasiedlających badaną

the amount of 1 g of DPP per 1 ml of buffer. Study was performed in flat-bottom 96 wells microplate (NUNCK). To each well there was added 25 ml of platelet poor plasma, 10 ml of chloramine T (4 mM) and appropriate amount of diamond powder: 0, 0.001, 0.025, 0.5, 0.1 mg. Wells were then filled up with PBS to volume of 230 ml with PBS. Immediately before measurement 20ml of luminol was added. Two control samples, free from diamond powder, were included. The first one did not contain chloramine T, whereas the second one did not contain plasma. Measurement of luminescence intensity was taken every third minute at temperature of 37°C, within 20 minutes, with use of multipurpose microplate reader VICTOR 1420 (WALLAC). The instrument was available for us in Department of Molecular and Medical Biophysics, Medical University of Lodz. Each sample of diamond powder was analyzed in triplicate.

Evaluation of susceptibility to platelet adhesion

Samples made of medical steel and these coated with NCD were preincubated in platelet poor plasma for 12 h at 4°C. After that, the samples were washed with phosphate buffer and exposed to contact with citrated whole human blood for 1 h. During this exposition samples were gently mixed. Each sample was incubated separately. The samples, after contact with blood, were washed with PBS, and fixed for 1 h at 4°C with 3% glutaraldehyde in PBS. The fixed samples were then dehydrated with gradient series of ethanol and air-dried. Finally samples were coated with 20 nm thick gold film in a sputtering apparatus (JEE - 4 X Jeol). HITACHI S - 3000N scanning electron microscope, which is owned by Institute of Material Sciences and Engineering, Technical University of Lodz, was used to examine of the specimens. Observations were made at a voltage of 5 kV. Pictures were collected in computer memory for further comparative analysis.

Resistance of surface to bacterial colonization

Every sample was placed into a separate container and submerged in medium containing NaCl (1%), bactopectone (1%) and yeast extract (0,5%), pH 7,0. A low count of *E.coli* cells ($2 \cdot 10^3$ per ml) was added into the medium and incubation was continued for 3 days at 28°C, with gentle mixing. In a separate set of experiments samples were pretreated with bovine serum albumin (BSA) (10 mg/ml), or human platelet poor plasma (PPP), for twenty four hours. After that, samples were extensively washed out, with distilled water, and then were subjected to the same treatment as described above. The incubation was finished by extensive washing of samples with distilled water. Then samples were fluorescently labeled by administration of 20ml of a fluorescent marker solution bis-benzidine (100 μ g/ml) onto each sample surface. The day was allowed to penetrate inwards cells (10 min. 28°C), in the dark. The fluorescent marker in cell interior was assimilated by double-strand DNA and in this form was fluorescently active. Finally, bacterial cells present at the sample surface were detected with the fluorescence microscope (Nikon TE 200) in the Department of Molecular Biophysics, University of Lodz. The pictures were documented with a CCD camera and were subjected into further analysis of quantity of *E.coli* cells present at the samples surface. The results from three independent experiments were statistically evaluated using the F-Snedecor test followed by the t-Student test.

Results and discussion

Any material designed for implants production must rigorously fulfill definite conditions. In the first-order it has to be non-toxic for recipient body. It can not interfere with com-

powierzchnię. Wyniki uzyskane z trzech niezależnych doświadczeń poddano ocenie statystycznej przy użyciu testu F-Snedecor'a oraz testu t-Studenta.

Wyniki i dyskusja

Materiał przeznaczony do wytwarzania implantów musi rygorystycznie spełniać określone warunki. W pierwszym rzędzie musi być nietoksyczny dla organizmu biorcy nie może interferować z powszechnie używanymi środkami farmakologicznymi a jego obecność musi być dobrze tolerowana przez organizm biorcy. Ogólnie mówi się wtedy, że dany materiał jest biogodny i dobrze biotolerowany. Jednak w zależności od specyficznych warunków w jakich ma pracować implant narzucają się dodatkowe warunki, których spełnienie jest niezbędne z punktu widzenia otaczających tkanek. Implanty kostne, przeznaczone do obrastania tkanką kostną, muszą mieć odpowiednio przygotowaną powierzchnię umożliwiającą dobrą adhezję komórek krwi i właściwy rozwój osteoblastów. Z kolei implanty przeznaczone do kontaktu z krwią muszą charakteryzować się bardzo niską podatnością na przyleganie komórek krwi i brakiem aktywacji układu krzepnięcia i fibrynolizy. Pogodzenie tak przeciwstawnych oczekiwań w jednym idealnym materiale jest niemożliwe. Dlatego też coraz częściej dąży się do ukierunkowanej modyfikacji powierzchni implantu w celu osiągnięcia specyficznych jego cech. Wytwarzanie warstw nanokrystalicznej węgla na metalicznych materiałach wydaje się być właściwym krokiem w kierunku uzyskania materiału przyjaznego kontaktowi z krwią. Warstwa NCD charakteryzuje się bardzo dobrymi parametrami mechanicznymi, ogranicza procesy korozyjne i wykazuje korzystną aktywność biologiczną (4).

Osocze krwi ludzkiej składa się z białek i składników mineralnych rozpuszczonych w wodzie oraz rozproszonych tam składników tłuszczowych. Jest to miejsce bardzo intensywnie zachodzących procesów biochemicznych, w tym powstawania i dezaktywacji wolnych rodników i reaktywnych form tlenu. Te wysoce aktywne chemicznie cząsteczki, jeśli pozostają zbyt długo w kontakcie z aktywnymi biologicznie makrocząsteczkami, są przyczyną niezliczonych chemicznych modyfikacji tych makrocząsteczek skutkujących zmianami w ich aktywności biologicznej. W przeprowadzonym doświadczeniu wykorzystano model zależnej od luminolu luminescencji, której intensywność jest proporcjonalna do ilości aktywnej formy tlenu - kwasu podchloraowego, generowanego przez zewnętrznie dodaną chloraminę T. Nasze badania wykazały, że obecność proszków diamentowych w osoczu ludzkim przyczynia się do usuwania tego silnego oksydanta. RYS. 1 przedstawia wyniki pomiaru intensywności luminescencji w funkcji koncentracji proszku diamentowego w osoczu. Należy jednak zauważyć, że spośród przebadanych proszków niektóre nie przejawiały tej cechy lub ich działanie było znacznie słabsze. Na obecnym etapie badań nie potrafimy wskazać ani przyczyny aktywności proszków w usuwaniu oksydantów, ani też cechy proszku determinującej jego antyoksydacyjne właściwości.

Adhezja płytek krwi do powierzchni implantu pośredniczona jest przez adhezywne białka osocza krwi. Preinkubacja próbek stali medycznej i stali medycznej pokrytej warstwą NCD w osoczu ubogopłytkowym sprzyjała odkładaniu się białek na powierzchniach. Następujący po tym etapie krótkotrwały kontakt z pełną krwią skutkował adhezją płytek krwi do badanych powierzchni. Jak wynika z przedstawionych przykładowych fotografii ze skaningowego mikroskopu elektronowego (RYS. 2), płytki krwi sporadycznie przylegały do powierzchni NCD, natomiast w du-

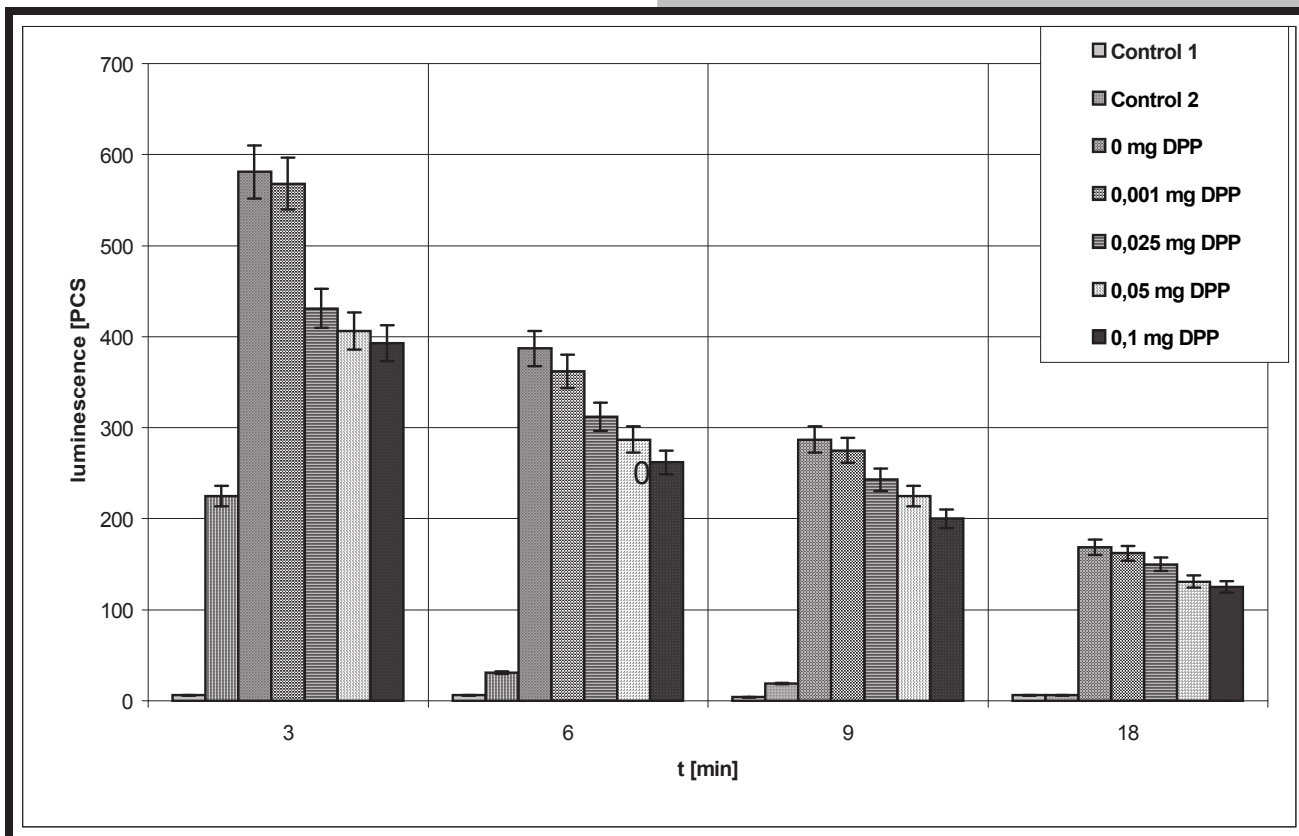
monly administered drugs and has to be tolerated by a recipient body well. Generally one can say then, that material is biocompatible and well exhibits high biotolerance. However in dependence on particular circumstances, in which implant has to work, additional conditions must be fulfilled in contact with surrounding tissue. Bone implants, designed to integrate with bone tissue, have to be prepared for enabling good adhesion of blood cells and proper growth of osteoblasts. On the other hand, implants designed for contact with blood have to be characterized by very low susceptibility to blood cells adhesion and lack of activation of thrombosis and fibrinolysis. Reconciliation so opposed expectations in one ideal material is impossible. Therefore present strategies are more and more often oriented to modification of implant surface in aim of achievement its specific needs. Production of nanocrystalline carbon layers on metallic materials seems to be proper step in a direction of obtaining of material friendly for contact with blood. NCD layer is characterized by very good mechanical parameters, limits of corrosion and it also shows profitable bioactivity (4).

Plasma of human blood consists of proteins, mineral components dissolved in water and dispersed aliphatic components. This is the place of very intense biochemical processes, between others formation and deactivation of free radicals and reactive oxygen species occur there. If these chemically extremely active molecules stay in too long contact with biologically active macromolecules, they cause innumerable chemical modifications of these macromolecules. In conducted experiments we have used the luminol dependent luminescence model, where the intensity of luminescence is proportional to quantity of reactive oxygen species - the hypochlorous acid, generated by the added chloramin T. Investigation shows that the presence of diamond powders in human plasma contributes to remove this strong oxidant.

FIGURE 1 presents results of measured luminescence intensity in plasma as a function of amount of DPP. It is worth to note, that some of examined DPP did not manifest these properties or their effect was considerably weaker. The present stage of investigation do not allow us to indicate neither the reason of various activity nor mechanisms of anti-oxidative property of DPP.

Platelet adhesion to implant surface is mediated by adhesive proteins of blood plasma. Preincubation of samples with platelet poor plasma causes accumulation of proteins on the surfaces. Following this stage, short contact with whole citrated blood resulted in adhesion of blood platelets to the studied surfaces. As it is seen in FIGURE 2 pictures obtained with scanning electron microscope depict rarely adhered platelet to NCD surface, whereas large number of platelets was found on medical steel surface. The only exception was found on damaged fragment of NCD surface, where different blood cells was found.

A susceptibility of surfaces of examined materials to microbial colonization and biofilm formation should be seriously considered during the procedure of implant design and production. If not, opportunistic microorganisms, present in a very limited number in recipient's body, could colonize the implant surface. It is extremely difficult to destroy a biofilm structure and fight down microbes present therein. Very often implant with surface-present biofilm has to be removed or exchanged. In our hands medical steel (316L), titanium alloy (Ti6Al4V) and medical steel coated NCD layer showed various susceptibility to *E. coli* cells colonization. As it is shown in FIGURE 3, the most susceptible to bacterial colonization was medical steel. Considerably less susceptible was titanium alloy whereas the highest re-



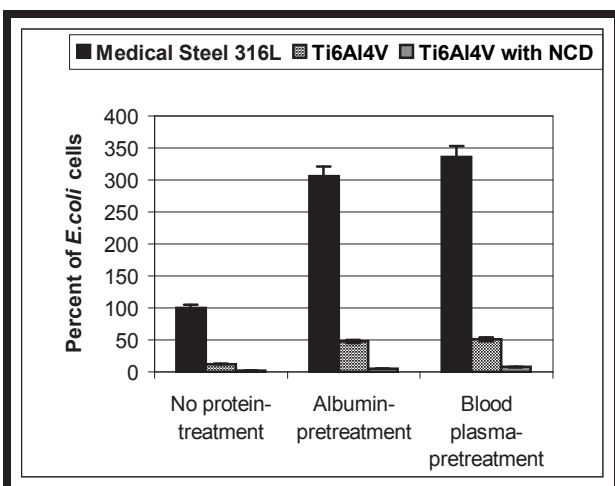
żej liczbie były znajdowane na powierzchni stali medycznej. Wyjątek stanowiły obszary uszkodzonej warstwy NCD, gdzie znajdowane były różne elementy morfotyczne.

Podatność materiału, przeznaczonego do produkcji implantów, na kolonizację mikroorganizmami i tworzenie na powierzchni biofilmu powinna być czynnikiem eliminującym ten materiał z zastosowań. W przeciwnym wypadku, nawet najbardziej rygorystycznie przestrzegane normy jakości w przygotowania implantu i jego umieszczenia w ciele biorcy mogą nie ustrzec przed rozwijającą się infekcją oportunistyczną. Oportunistyczne mikroorganizmy, ciągle obec-

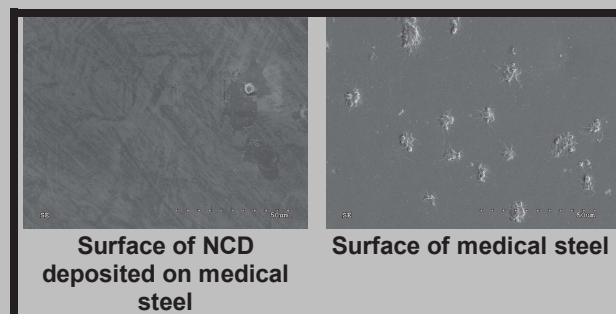
RYS. 1. Zmiany w intensywności luminescencji w osoczu krwi jako funkcja czasu oraz ilości DPP.
FIG. 1. Luminescence intensity observed for blood plasma as a function of time and DPP amount.

sistance to bacterial colonization exhibited surface of NCD layer.

Summing up, a high trombocompatibility additionally supported by the resistance to microorganisms colonization and anti-oxidative properties of NCD layer, indicate this material as a very promising for use in contact with blood.



RYS. 3. Porównanie ilości komórek E.coli na powierzchni badanych materiałów. Ilość komórek znajdujących się na stali medycznej, nie inkubowanej z białkiem, przyjęto za 100%.
FIG. 3. Comparison of quantity of E.coli cells found at the studied surfaces. The quantity found at the protein non-treated medical steel was used as 100%.



RYS. 2. Wynik analizy SEM adhezji płytek krwi do stali medycznej (po prawej) i stali medycznej pokrytej NCD (po lewej).
FIG. 2. Results of SEM analysis of blood platelet adhesion to medical steel (right) and NCD coated medical steel (left).

ne w niewielkiej liczbie w ciele biorcy, wykorzystają bezwarunkowo sytuację gdy tylko znajdą przyjazną sobie powierzchnię. Gdy już skolonizują tę powierzchnię i wytworzą biofilm, walka z nimi będzie praktycznie niemożliwa. Implant taki nadaje się tylko do wymiany. Badane przez nas materiały - to jest stal medyczna, stop tytanu (Ti6Al4V), oraz stal medyczna pokryta warstwą NCD, wykazały różnorodną podatność na kolonizację komórkami *E.coli*. Jak łatwo zauważyć na RYS. 3. Najbardziej podatna na kolonizację bakteryjną był stal medyczna. Znacznie mniej podatny był stop tytanu. Najwyższą oporność na zasiedlanie komórkami bakteryjnymi wykazywała powierzchnia NCD.

Reasumując nasze badania, wysoka trombozgodność warstwy NCD, poparta dodatkowo opornością na kolonizację mikroorganizmami i właściwościami antyoksydacyjnymi, dobrze rokuje w zastosowaniach tego materiału w kontakcie z krwią.

Podziękowania

Praca częściowo finansowana przez KBN w ramach grantów: 7 T08D 036 21 i PBZ KBN 082/T08/13.

WŁAŚCIWOŚCI WARSTW NCD JAKO POKRYĆ WŁÓKIEN ŚWIATŁOWODOWYCH W ZALEŻNOŚCI OD PARAMETRÓW PROCESU RF PCVD

M. ŚMIETANA*, J. SZMIDT*, M. DUDEK**, P. NIEDZIELSKI**

*INSTYTUT MIKROELEKTRONIKI I OPTOELEKTRONIKI,
POLITECHNIKA WARSZAWSKA,
KOSZYKOWA 75, 00-665 WARSZAWA

**INSTYTUT INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ,
POLITECHNIKA ŁÓDZKA,
STEFANOWSKIEGO 1/15, 90-924 ŁÓDŹ

Streszczenie

Komunikat przedstawia właściwości pokryć diamentopodobnych otrzymanych w metodzie RF PCVD (Radio Frequency Plasma Chemical Vapour Deposition) na kwarcowych rdzeniach światłowodów typu PCS (Polymer Clad Silica), które mogą być wykorzystane jako głowice czujników. Poruszono problem technologicznego osadzania warstw DLC i NCD na podłożach dielektrycznych oraz opracowano sposób umieszczania próbek w reaktorze i takiego przeprowadzenia procesu, aby otrzymać oczekiwany efekt. Zaprezentowano wpływ parametrów procesu osadzania na transmisję światłowodów. Otrzymane pokrycia można scharakteryzować jako trwałe i cechujące się dobrą adhezją. Wykonano zdjęcia pokryć za pomocą Skaningowego Mikroskopu Elektronowego (SEM) oraz Mikroskopu Sił Atomowych (AFM). Eksperyment

Acknowledgements

This work was partially supported by the KBN grant No. 7 T08D 036 21 and PBZ KBN 082/T08/13.

Piśmiennictwo

References

- [1] Mitura S., Mitura A., Niedzielski P., Couvrat P., Nanocrystalline Diamond Coatings. J Chaos, Solitons and Fractals, 1999; 10: 2165-2177.
- [2] Mitura S., Niedzielski P., Jachowicz D., Langer M., Marciniak J., Stanishevsky A., Tochitsky E., Louda P., Couvrat P., Denis M., Lourdin P., Influence of carbon origin on the properties important for biomedical application. Diamond and Related Materials 1996; 5: 1185-1188.
- [3] Walkowiak B., Kochmanska V., Jakubowski W., Okroj W., Krolczak V. Interaction of body fluids with carbon surfaces. J Wide Bandgap Materials 2002; 9:231-242.
- [4] Bakowicz K., Mitura S., Biokompatibility of NCD. Wide Bandgap Materials 9, 2002; 9: 261-272.

PROPERTIES OF DIAMOND-LIKE CLADDING FOR OPTICAL FIBRES DEPENDING ON RF PCVD PROCESS PARAMETERS

M. ŚMIETANA*, J. SZMIDT*, M. DUDEK**, P. NIEDZIELSKI**

*INSTITUTE OF MICROELECTRONICS AND OPTOELECTRONICS,
WARSAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,
KOSZYKOWA 75, 00-665 WARSAW (POLAND)

**INSTITUTE OF MATERIALS SCIENCE AND ENGINEERING,
TECHNICAL UNIVERSITY OF LODZ,
STEFANOWSKIEGO 1/15, 90-924 ŁÓDŹ (POLAND)

Abstract

The manuscript presents properties of diamond-like carbon cladding deposited with the Radio Frequency Plasma Chemical Vapour Deposition (RF PCVD) method onto Polymer Clad Silica (PCS) optical fibre, which can be used as a sensing head. A technological subject of depositing diamond-like carbon (DLC) and nanocrystalline diamond (NCD) layers onto dielectric substrates is also raised. An original way of placing samples in a plasma reactor and process taken in order to get a desirable effect were worked out. An influence of deposition process parameters on fibre's transmission is presented. The coats can be characterized by good adhesion and stability. Scanning Electron Microscopy (SEM) and Atomic Force Microscopy (AFM) images of the deposited layer were made. The experiments prove very