

Thesis ETH No 13079

**MODULATION OF CELL COMPATIBILITY
OF AMORPHOUS HYDROGENATED
CARBON (a-C:H) FILMS BY INCLUSION
OF METALLIC ELEMENTS**

Dissertation submitted to the

SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH

for the degree of

DOCTOR OF TECHNICAL SCIENCES

presented by

ANNICK SCHROEDER

Dipl. Natural Sciences ETH

born on April 29, 1971

in Luxembourg

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. E. Wintermantel, examiner

Prof. Dr. F. E. Würigler, co-examiner

1999

SUMMARY

Properties like hardness, chemical inertness, low coefficient of friction, corrosion resistance and biological acceptance make amorphous hydrogenated carbon (a-C:H) films an interesting candidate for protective coatings in biomedical applications. The purpose of this study was to evaluate several new functional surface coatings by combining the advantages of a-C:H coatings with the biological acceptance or non-acceptance of metals. Cellular functions should be modulated by adding various concentrations of different metallic elements to the a-C:H matrix, in this case *titanium*, *vanadium*, *copper* and *silver*. The biological performance was assessed, using primary bone marrow cells from adult rats, and special focus was put on the relation between bone forming cells (i.e. osteoblasts) and cells responsible for bone resorption (i.e. osteoclasts). It was presumed, that a-C:H/metal films could influence cell behavior in two different ways. First, a-C:H/Ti and partly, a-C:H/V coatings, were meant to act through the chemical composition of their surfaces and subsequent protein adsorption. Second, a-C:H/Cu and a-C:H/Ag should achieve their influence on cell behavior through the release of ions.

a-C:H/titanium films, presenting a surface composed mainly of titanium oxide and titanium carbide, were able to stimulate cell proliferation. Simultaneously, a reduction of osteoclast activity was observed. Protein adsorption studies showed that different proteins adsorbed to the surfaces in different amounts, depending on Ti concentration. Since many materials known to be relatively inert in bulk form, induce adverse tissue reactions if present in particulate form, a-C:H and a-C:H/Ti particles were subjected to cell culture tests. Pure a-C:H particles did not influence bone marrow cell cultures, although the cells could internalize particles. However, a-C:H/Ti particles stimulated cell proliferation whereas no stimulation of osteoclast cells could be observed.

Vanadium, at concentrations higher than 7 at.%, in a-C:H matrix, reduced cell proliferation as well as cell differentiation almost completely. But adverse cell reactions could be observed at even lower vanadium concentrations. Additionally, the influence of changes in oxygen tension on biocompatibility assessment using cell culture techniques was analyzed. Reducing partial oxygen tension from 20% to a more physiological value of 10% made bone marrow cells appear less sensitive to the toxic influence of a-C:H/vanadium films.

Whereas the first two coating systems were hypothesized to influence cell behavior through contact mechanism, the following a-C:H/Cu and a-C:H/Ag coatings were based on the idea, that metallic components released into surrounding medium could subsequently influence cell performances. BMC cultures responded in a dose dependent way

to Ag content in a-C:H matrix. Copper in an a-C:H matrix also reduced cell proliferation, but did not affect cell differentiation.

In conclusion, it could be shown in this study, that the addition of the four different metals described above, could influence cell proliferation and cell differentiation in different ways. Therefore a-C:H coatings could be considered as suitable surface coating which can be adapted towards different biomedical applications through the addition of specific metallic elements, depending on the clinical demands.

ZUSAMMENFASSUNG

Eigenschaften wie Härte, chemische Inertheit, niedriger Reibungskoeffizient sowie Biokompatibilität, machen aus amorphen Kohlenwasserstoff-Filmen einen interessanten Kandidaten für verschiedene Anwendungen im biomedizinischen Bereich. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob die Dotierung mit metallischen Elementen- in diesem Fall Titan, Vanadium, Kupfer und Silber - zu den a-C:H Filmen, die Reaktionen von Knochenmarkzellkulturen in vitro beeinflussen könnte. Dabei wurde die Differenzierung von knochenaufbauenden Zellen (Osteoblasten) im Verhältnis zu knochenabbauenden Zellen (Osteoclasten) untersucht. Die Zellen sollten durch zwei unterschiedliche Wirkmechanismen von den Filmen beeinflusst werden: das erste System, a-C:H/Ti, und bis zu einem gewissen Grad, auch a-C:H/V Filme sollen über die Oberflächenszusammensetzung und die dadurch folgende Proteinadsorption auf die Zellen wirken. Beim zweiten System, a-C:H/Cu and a-C:H/Ag Filme, sollten die Effekte auf die Zellen durch das Freisetzen von Ionen bewirkt werden.

a-C:H/Titan Filme, deren Oberflächen vorwiegend aus Titancarbid und Titandioxid bestanden, bewirkten eine erhöhte Zellproliferation. Zugleich wurde eine Reduktion der knochenabbauenden Zellen beobachtet. Zusätzlich wurden unterschiedliche Proteinadsorptionen, abhängig vom Titangehalt der Filme, ermittelt. Da ein partikulärer Werkstoff einen anderen Einfluß auf Zellen haben kann als ein nicht-partikulärer Werkstoff, wurden zusätzlich Zellkulturversuche mit a-C:H und a-C:H/Ti Partikeln unternommen. Reine a-C:H Partikel beeinflussten die Zellen nicht, obwohl man eine Aufnahme der Partikel durch die Zellen feststellen konnte. Die a-C:H/Ti Partikel induzierten, trotz einer Zunahme der Zellzahl, eine Stimulation der Osteoclasten nicht.

Vanadium, in Konzentrationen höher als 7 at.%, in a-C:H Filmen reduzierte die Proliferation ebenso wie die Differenzierung der Knochenmarkzellen fast vollständig. Aber auch bereits bei geringen Mengen Vanadium wurden negative Auswirkungen auf die Zellkulturen beobachtet. Des weiteren wurde ein Einfluß von einer Änderung des Sauerstoffpartialdruckes von 20% (Standard) auf 10% (näher am physiologischen Wert) auf die Zellkulturen festgestellt. Die Senkung des Sauerstoffpartialdrucks bewirkte, daß die Knochenmarkzellen weniger empfindlich auf die toxische Wirkung von a-C:H/V Filmen reagierten. Es scheint also wichtig, die Auswirkungen eines nicht-physiologischen Sauerstoffpartialdrucks in vitro mit in Betracht zu ziehen, bei der Aussage betreffend Biokompatibilität.

a-C:H/Kupfer und a-CH/Silber Filme wirkten vorallem durch die Freisetzung von Metall-Ionen auf die Knochenmarkkulturen. Silber bewirkte eine dosis-abhängige

Reduktion der Zellzahl. Auch Kupfer in a-C:H reduzierte das Zellwachstum, allerdings ohne die Differenzierung zu beeinträchtigen.

Durch die Zugabe der oben erwähnten metallischen Elemente konnte die Proliferation und die Differenzierung der Knochenmarkzellen in spezifische Richtungen gelenkt werden. Somit könnten a-C:H Filme eine geeignete Oberflächenbeschichtungen bilden, die durch die Zugabe von Metalle in bestimmten Konzentrationen den jeweiligen klinischen Anforderungen angepaßt werden könnte.