

Piin soluyhteensopivuuden parantaminen mikrokuvioinnilla

Emilia Kaivosoja^{1,2}, Sami Myllymaa³, Vesa-Petteri Kouri^{1,2}, Katja Myllymaa^{3,4},
Reijo Lappalainen³, Yrjö T. Konttinen^{1,5,6}

¹Sisätautien osasto, Kliininen laitos, HY

²Anatomian osasto, Biolääketieteen laitos, HY

³Fysiikan laitos, KY;

⁴Mikrosensorilaboratorio, Savonia AMK

⁵Tieteellinen tutkimus ORTON

⁶Tekonivelsairaala COXA

Micro-texturing with biomaterials might enhance cytocompatibility of silicon-based micro-electro-mechanical-system dummies. Diamond like carbon, Ti, Ta and Cr patterns were produced on silicon using photolithography-physical vapour deposition. At 48-hours SaOS-2 cells on 1) large-size patterns assumed geometrical architectures, 2) medium-size patterns (slightly smaller than cells) were inhabited by singular cells, which stretched often from an island to other islands, assuming branching morphologies, and 3) on small-size cellular filopodia bypassed cell-unfriendly silicon. Actin cytoskeleton and vinculin-containing adhesion junctions turned up on biomaterial, but not on silicon. Cell density/coverage disclosed a 2-3.7-fold preference for the biomaterial patterns over silicon substrate ($p < 0.001$). In conclusion, enhancement by micro-patterning depends on the pattern size, shape and material and can be used to improve biocompatibility.

Kehitettäessä uusia biomateriaaleja ja lääketieteellisiä laitteita on tärkeää oppia ymmärtämään paremmin solu-substraatti-vuorovaikutuksia, jotta halutunlaista soluvastetta voidaan ohjata. Materiaalin pinnan ominaisuudet määräävät, miten biologiset molekyylit adsorboituvat pintaan (1–3) ja nämä adsorboituneet molekyylit edelleen säätelevät solujen käyttäytymistä. Lisäksi pinnan mikro- ja nanomittakaavan topografia vaikuttaa monella tavalla solujen käyttäytymiseen (4). Järjestäytyneiden pintarakenteiden avulla voidaan tutkia pinnan eri tekijöiden vaikutusta solujen adheesioon (4), lisääntymiseen (5), selviytymiseen (6) sekä toimintaan (7), toisin sanoen implantin bioyhteensopivuutta. Järjestäytyneitä ja hyvin määriteltyjä kuvioita materiaalin pintaan voidaan tehdä esimerkiksi valolitografialla tai pehmytlitografialla (8).

Tulevaisuudessa älykkäiden implanttien, kuten biologisten mikroelektromeekaanisten järjestelmi-

en (biological microelectromechanical systems, BioMEMS), käyttö tulee lisääntymään ja niitä voidaan käyttää esimerkiksi antureina ja lääkeaineannostelijoina (9). BioMEMS-laitteiden valmistuksessa joudutaan käyttämään piitä, jota hyödynnetään runsaasti elektroniikkateollisuudessa. Pii ei kuitenkaan ole bioyhteensopiva materiaali, vaan se aiheuttaa immunologisia reaktioita rajoittaen laitteiden käyttöä elimistössä (10). Toiminnallisista syistä johtuen BioMEMS-laitteita ei aina voida pinnoittaa kokonaan. Tässä työssä oletettiin, että mikrokuvioitujen bioMEMS-alustojen soluyhteensopivuutta voidaan säädellä pinnan rakenteiden ja pintakemian avulla.

Hypoteesimme on, että jo osittaisella pinnoituksella, kuvioinnilla, voidaan parantaa bioMEMS-laitteiden soluyhteensopivuutta. Valolitografia yhdistettynä ohutkalvopinnoitukseen on oiva työkalu mikrokuvioitujen pintojen valmistamiseen, koska tällöin sekä

kuvioiden muoto että pinnoituksen paksuus ovat tarkasti säädeltävissä. Lisäksi nämä menetelmät soveltuvat bioMEMS-laitteiden ohella myös moniin muihin kudosteknologian sovelluksiin parantamaan solujen adheesiota ja integraatiota.

Osittain kuvioitujen piipintojen vaikutusta luusoluihin ei ole tutkittu kovin paljoa ja tutkimukset ovat keskittyneet lähinnä polymeereihin (11–16) tai kultaan (17). Näissä kokeissa oli saavutettu lupaavia tuloksia ja tässä työssä tavoitteena on laajentaa tutkimus koskemaan timantti- (diamond like carbon, DLC) ja metallipinnoitteita. DLC:llä kuvioituja piipintojen vaikutusta soluihin on aiemmin tutkittu ainoastaan neuroblastomasoluilla (18). DLC on lupaava pinnoitemateriaali, jolla on hyviä fysikaalisia ja kemiallisia ominaisuuksia, kuten alhainen kitka, korkea korroosionsietokyky ja bioyhteensopivuus (19,20). Tutkimuksessa käytetyt metallit puolestaan ovat yleisesti implanttien metalliseoksissa käytettyjä metalleja.

Menetelmät

Mikrokuvioidut pinnat valmistettiin käyttäen aiemmin kuvattuja menetelmiä (21). Yksittäisen näytteen koko oli 10 mm x 10 mm. Kaksi ensimmäistä näytesarjaa valmistettiin DLC- ja titaanipinnoitteilla. Ensimmäisessä näytetyypissä oli neljä 4 mm x 4 mm aluetta, joista yksi oli verokkipinta ilman kuviointia ja kolme muuta oli kuvioitu 5, 25 ja 125 µm ympyröin tai neljöllä. Kuvioiden koosta riippumatta pinnat oli valmistettu siten, että ympyrät peittivät 30,6 % ja neljöt 25 % kokonaispinta-alasta. Toinen näytetyyppi oli ensimmäistä vastaava, mutta käänteinen, eli kuviot olivat piitä ja tausta DLC:tä tai titaania. Kolmannessa näyte-erässä tutkittiin DLC:n ja titaanin lisäksi tantaalia ja kromia. Näissä näytteissä oli 75 µm x 75 µm biomateriaalinelioitä 100 µm etäisyydellä toisistaan, jolloin pinnoite peitti 18,4 % kokonaispinta-alasta. Eri näytetyypit on havainnollistettu Kuvassa 1.

Soluviljelmät

Ihmisen primäärisen osteosarkoman SaOS-2 (ECACC 890500205) soluja viljeltiin 10 cm Petri-maljoissa (Corning Inc., Corning, NY, USA). Elatusaineena käytettiin McCoy 5A -viljelynestettä, joka sisälsi GlutaMAXTM:a (Gibco BRL/Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD) ja 10 % sikiövasikanseerumia sekä 100 IU/ml penisilliiniä ja 100 µg/ml streptomysiiniä. Soluja kasvatettiin 80 % konfluenssiasteeseen saakka 37°C lämpötilassa soluviljelykaapissa (CO₂ 5 %).

Kun solut olivat saavuttaneet 80 % konfluenssiasteen, media poistettiin ja solukerros pestiin kahdesti fosfaattipuskuroidulla 10mM fysiologisella suolaliuksella (pH 7.4). Solut irrotettiin inkuboimalla soluja 37°C-lämpötilassa 5 min 0.25 % trypsiini-etyleenidiamiini-tetraetikkahappoliuoksessa. Irronneet solut suspensioitiin viljelynesteseen ja jaettiin biomateriaalipinnoille 15-25 x 10³ cm⁻² tiheydessä. Kaikissa kokeissa käytettiin 12-kuoppalevyjä (Corning Inc., Corning, NY, USA). Kokeet tehtiin käyttäen neljää rinnakkaisnäytettä ja kaikista näytteistä analysoitiin neljä kuvaa.

Elektronimikroskopia

Soluja kasvatettiin näytteiden päällä 48 tai 120 tuntia soluviljelykaapissa (37°C, 5 % CO₂), jonka jälkeen näytteet siirrettiin uudelle kuoppalevyille, pestiin kahdesti fosfaattipuskuroidulla suolaliuksella ja kiinnitettiin yön yli 2,5 % glutaraldehydissä (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA). Kiinnityksen jälkeen näytteet huuhdeltiin fosfaattipuskuroidulla suolaliuksella ja kuivatettiin etanolisarjassa (50 %, 70 %, 90 %, 94 % sekä absoluuttinen etanoli). Kuivaus viimeisteltiin kriittisen pisteen kuivausmenetelmällä Bal-Tec CPD 030 -laitteella (BAL-TEC AG, Balzers, Liechtenstein). Kuivatut näytteet kiinnitettiin alustoille ja pinnoitettiin ohuella platinakerroksella Agar-sputterointilaitteella (AGAR, Stansted, Englanti). Näytteet kuvattiin Zeiss DSM 962 elektronimikroskoopilla (Carl Zeiss, Oberkochen, Saksa) käyttäen 10 kV kiihdytysjännitettä.

Konfokaalimikroskopia

Soluja kasvatettiin näytteiden päällä 48 tuntia, jonka jälkeen ne kiinnitettiin 4 % paraformaldehydissä 10 min ajan. Tämän jälkeen näytteitä permeabilisoitiin 0,1 % v/v Triton X-100 liuoksella 10 min. Epäspesifi värjäytyminen estettiin inkuboimalla näytteitä tunti vuohen seerumissa (1:30 laimennos). Tämän jälkeen näytteitä inkuboitettiin tunti primäärisessä anti-vinkuliini vasta-aine liuoksessa (1:5 laimennos) ja 30 min sekundäärisessä Alexa fluor 488-konjugoidussa vasta-aineessa (vuohen anti-hiiri IgG, 1:400 laimennos; Molecular Probes, Eugene, USA). Aktiini värjättiin inkuboimalla Alexa fluor 568-konjugoitua falloidiinia (1:30 laimennos Invitrogen, Carlsbad, USA) yhdessä sekundäärisvasta-aineen kanssa ja tuma värjättiin inkuboimalla näytteitä TO-PRO-3:ssa (1:1000 laimennos tislatussa vedessä) 10 min. Vaiheiden välissä näytteet pestiin fosfaattipuskuroidulla suolaliuksella ja laimennokset tehtiin fosfaattipuskuroituun suolaliuok-

seen, jossa oli 0,1 % naudan albumiinia, ellei erikseen muuta ole mainittu. Näytteet kiinnitettiin objektiivilaseille ja kuvattiin Olympus AX70 -fluoresenssimikroskoopilla (Olympus, Wien, Itävalta) sekä Leica TCS SP2 -konfokaalimikroskoopilla (Leica Microsystems GmbH, Mannheim, Saksa).

Datan analysointi

Kolmannesta näyte-erästä laskettiin solujen tiheys ja peittävyys. Solujen lukumäärä laskettiin siten, että solut luokiteltiin kuviolle, taustalle tai rajapinnalle (< 70 % solusta kuviolla tai taustalla). Solujen peittävyys laskettiin 0.490 mm² alueelta, jossa kuviointi peitti 0.097 mm² kokonaispinta-alasta. Peittävyys laskettiin puoliautomaattisesti Matlabilla (The MathWorks Inc., Natick, MA, USA). Tausta, joka ei ollut peittynyt soluilla, saatiin segmentoitua soluista ja kuvioista Cannyn reunanhakuoperaattorin avulla. Kuviot ja solut saatiin vielä segmentoitua manuaalisesti soveltamalla Cannyn reunoja toistamiseen aiemmin segmentoituun kuvaan ja vertaamalla tätä kuvaa alkuperäiseen kuvaan ja valitsemalla peittymättömät kuviot. Menetelmän tarkkuus ei ole 100 %, mutta syntyneet virheet ovat systemaattisia, eli eri näytteitä voidaan verrata keskenään luotettavasti. Solujen koko saatiin laskettua jakamalla solujen peittämällä prosentuaalinen pinta-ala niiden tiheydellä.

Tilastollinen analyysi

Ryhmien välisten erojen tilastollista merkittävyyttä arvioitiin varianssianalyysin (one-way ANOVA) ja Tukey HSD Post-Hoc -testin avulla. Tulokset on esitetty keskiarvo ± keskiarvon keskihajonta.

Tulokset

Kuvioiden koon ja muodon kvalitatiivinen vaikutus soluihin lyhyessä viljelmässä

Tässä kokeessa käytettiin DLC:llä ja titaanilla kuvioituja pintoja (kuva 1, paneelit A ja B). Lyhyessä 48 tunnin kokeessa SaOS-2 solut tarttuivat ja levittäytyivät hyvin isoille titaanineliöille ja -ympyröille, joille mahtui useita soluja. Kuvioiden muoto selvästi vaikutti solujen adheroitumiseen ja levittäytymiseen, sillä solut myötäilivät kuvioiden reunoja (kuva 2, paneelit A ja B). Käänteisillä näytteillä, jossa oli piikuvioita titaani- ja DLC-taustalla, solut karttoivat piikuvioita ja levittäytyivät biomateriaalitaustalla seuraillen kuvioiden

reunoja (kuva 2, paneeli C). DLC:llä (kuva 2, paneeli D)tämä ohjausvaikutus ja soluyhteensopuvuus oli selkeästi heikompi kuin titaanilla (kuva 2, paneeli A).

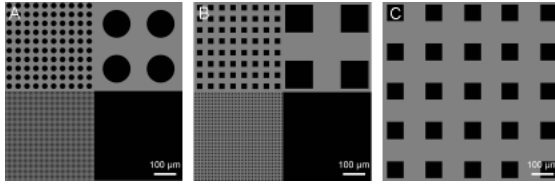
Havainto, että solut suosivat biomateriaalia ja karttoivat piitä, vahvistettiin myös solutukirangan aktiinin immunofluoresenssivärjäyksellä, joka osoitti aktiinisäikeiden järjestäytyneen hyvin biomateriaalipinnalla, mutta heikosti piillä (kuva 3, paneeli A). Konfokaalimikroskoopilla analysoitu kolmoisvärjäys osoitti, että aktiinisäikeiden järjestäytymiseen biomateriaalilla vaikutti vinkuliinia sisältävien adheesioliitosten muodostuminen, sillä liitoksia havaittiin biomateriaalilla, mutta harvemmin piillä (kuva 3, paneeli B).

Keskikokoiset neliöt ja ympyrät (25 µm) olivat pienhköjä verrattuna soluihin ja kuviolle mahtui yksittäinen solu. Keskikokoisilla kuvioilla solut eivät myötäilleet kuvioiden reunoja enää yhtä selkeästi (kuva 4, paneeli A). Tyypillisesti jokainen solu peitti yhden allaan olevan kuvioin, mutta pyrki kontaktiin muilla kuvioilla olevien solujen kanssa (kuva 4, paneeli B). Jotkin solut kurkottelivat kuviolta toiselle ja peittivät alleen kaksi kuviota (15 µm välimatka ympyröiden välillä), jolloin solun muoto venähti (kuva 4, paneeli c). Toisinaan solut levittäytyivät kolmelle tai useammalle kuviolle, jolloin niiden muodosta tuli tähtimäinen (ei kuvaa). Käänteisillä näytteillä solut tarttuivat biomateriaalitaustaan ja niiden muoto oli tyypillisesti venähäntyt ja hieman pyöreä, kun ne ahtautuivat kuvioiden välisille pienille väylille (vain 15 µm ympyröiden välillä; kuva 4, paneeli D). Jotkut solut näillä näytteillä eivät tarttuneet pintaan tai irtosivat siitä, jolloin niiden muoto oli hyvin pyöreä (ei kuvaa). Keskikokoisilla kuvioilla vaikutukset titaani- ja DLC-näytteillä olivat hyvin samankaltaiset, eli myös DLC-näytteillä solut suosivat biomateriaalipintaa ja välttivät piitä ja jopa kilpailivat DLC-kuvioista (kuva 4, paneeli E).

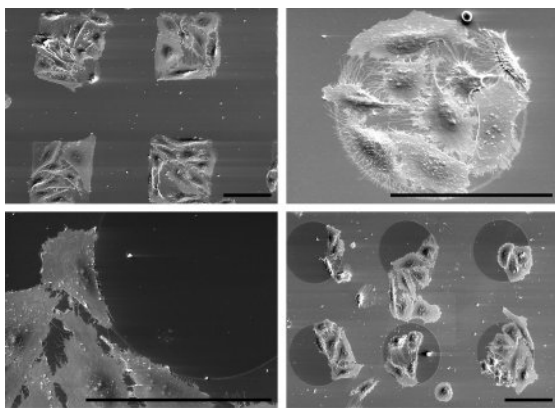
Pienillä neliöillä tai ympyröillä (5 µm) havaittiin vastaavasti, että solut suosivat biomateriaalipintaa ja välttivät piitä, riippumatta siitä oliko pii kuvioilla vai taustalla. Yksittäiset kuviot olivat huomattavasti soluja pienempiä, eli solut peittivät useita kuvioita (kuva 5, paneeli A). Kuitenkin havaittiin, että solujen filopodit pyrkivät pääsemään soluystävälliselle biomateriaalipinnalle ja välttämään piipintaa (kuva 5, paneeli A).

Kuvioiden koon ja muodon kvalitatiivinen vaikutus soluihin pitkässä viljelmässä

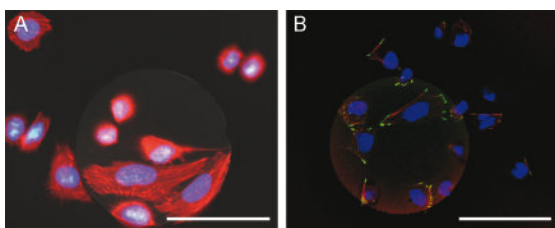
120 tunnin kasvatuksen jälkeen solut muodostivat lähes yhtenäisen solukerroksen DLC- ja titaanikuvioille piipinnoille (kuva 6, paneeli A). Kaksi poik-



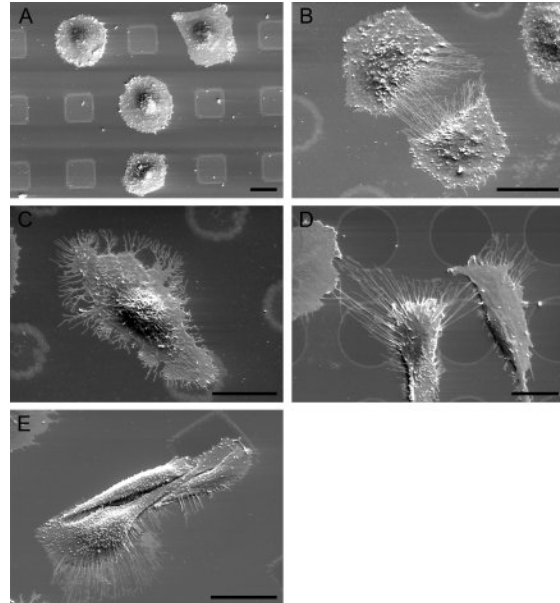
Kuva 1. Erilaiset näytetyypit. Kuvassa 800 µm x 800 µm alue näytteitten keskeltä. Paneeleissa A ja B tummat alueet esittävät timantti- tai timanttikuvioita vaalealla piitaustalla tai päinvastoin. Paneelissa C tummat alueet esittävät titaani-, tantaali-, kromi- tai DLC-kuvioita piitaustalla.



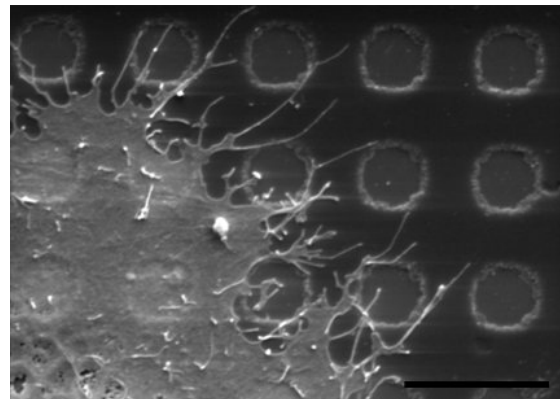
Kuva 2. Elektronimikroskooppikuva SaOS-2 soluista osoittaa, että solut ovat adheroituneet ja levittäytyneet suurille titaanineliölle (paneeli A) tai -ympyröille (paneeli B) ja käänteisillä näytteillä titaanitaustalle (paneeli C), ja myötäilevät soluystävällisen materiaalin reunoja. Timanttikuvioilla (paneeli D) soluyhteensopivuuden paranemisen ja ohjausvaikutukset ovat heikompia kuin titaanilla. Mittajana on 100 µm.



Kuva 3. Immunofluoresenssivärijäys aktiinista (punainen) SaOS-2 soluissa (tuma sininen) osoittaa aktiinitukirangan järjestäytymisen (paneeli A). Kolmoisvärijäys aktiinista (punainen), tumasta (sininen) ja vinkuliinistä (vihreä) osoittaa, että järjestäytyminen johtuu oletettavasti vinkuliinia sisältävien adheesioliitosten muodostamisesta. Mittajana on 50 µm.



Kuva 4. Keskikokoisille kuvioille kiinnittyneet solut eivät myötäileet kuvioiden reunoja enää yhtä selkeästi. Paneelissa A solut ovat keskikokoisilla biomateriaalinelillä ja paneeleissa B ja C keskikokoisilla biomateriaaliympyröillä. Käänteisesti kuvioituilla pinnoilla solut tarttuivat taustaan (paneeli D). Solut keskikokoisilla timanttinelillä (paneeli E). Mittajana on 20 µm.



Kuva 5. Solut pienillä kuviolla peittivät lukuisia timanttikuvioita ja taustaa. Solujen filopodit kuitenkin hakeutuivat biomateriaalipinnoilla ja välttelivät piitaustaa. Mittajana on 10 µm.

keusta kuitenkin oli; ohjausvaikutus oli vielä havaittavissa suurilla titaanikuvioidella (kuva 6, paneeli B) ja kuvioimattomalla homogeenisellä DLC-pinnalla melkein kaikki solut olivat irronneet (kuva 6, paneeli C).

Kuvioiden kvantitatiivinen vaikutus soluihin

Kvantitatiivinen tutkimus toteutettiin näytteillä, jossa oli DLC-, titaani-, tantaali- tai kromineliöitä piillä (kuva 1, paneeli C). 48 tunnin viljelyn jälkeen solujen tiheys kaikilla neljällä materiaalilla oli biomateriaalikuvioidella 2,9–3,7 kertaa suurempi kuin piitaustalla ($p < 0.000000001$, kuva 7). Verrattaessa ohjausvaikutuksen voimakkuutta, ainut tilastollisesti merkittävä ero oli, että timantin ohjausvaikutus oli kromin vastaavaa voimakkaampi ($p < 0.03$). Lisäksi soluja oli vähemmän DLC-kuvioilla verrattuna kromikuvioiden ($p < 0,03$) ja DLC-kuvioiden rajapinnalla soluja oli vähemmän kuin muiden materiaalien rajapinnalla ($p < 0,002$).

Solujen peittävyys titaanilla, tantaalilla, kromilla ja DLC:llä oli 2,0–3,0 kertaa suurempi kuin piillä ($p < 0.001$, kuva 8). Solut peittivät suuremman osan titaani- ja tantaalikuvioiden kuin DLC-kuvioista ($p < 0,02$) ja lisäksi suuremman osan titaanikuvioiden kuin kromikuvioiden ($p < 0,02$). Titaani- ja krominäytteillä solut peittivät suuremman osan piitausta kuin DLC-näytteillä ja tantaalinäytteillä ($p < 0,001$). Suurin kuvio-tausta-peittävyysuhde oli tantaalilla ja toiseksi suurin DLC:llä ja nämä erosivat merkittävästi kromin ja titaanin vastaavista luvuista ($p < 0,0002$).

Kuvioilla kasvaneet solut olivat merkittävän paljon pienempiä (13–41 %) kuin taustalla kasvaneet solut ($p < 0,0002$ muut paitsi tantaali). Materiaaleja verrattaessa solut titaanikuvioidella olivat suurempia kuin kromikuvioidella ($p < 0,003$) ja solut tantaalikuvioidella olivat suurempi kuin DLC- ja kromikuvioidella ($p < 0,03$; kuva 9, paneeli A). Titaaninäytteillä solut piitaustalla olivat merkittävän paljon suurempia kuin muiden näytteiden piitaustalla ($p < 0,006$), vaikka taustamateriaali ja valmistusmenetelmät olivat samat kaikille näytteille (kuva 9, paneeli B). Solujen koko titaaninäytteiden piitaustalla oli 40 % suurempi kuin DLC-näytteiden piitaustalla ja yli 25 % suurempi kuin kromi- ja tantaalinäytteiden piitaustalla.

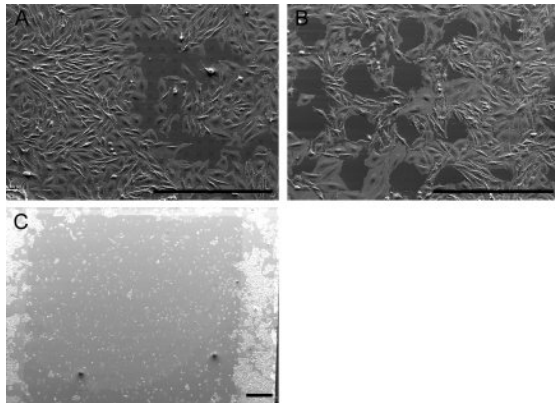
Pohdinta

Pii, joka on maankuoren toiseksi yleisin alkuaine, on puolijohdeomaisuuksiensa ja edullisuutensa vuoksi runsaassa käytössä elektroniikassa. Luonnossa pii

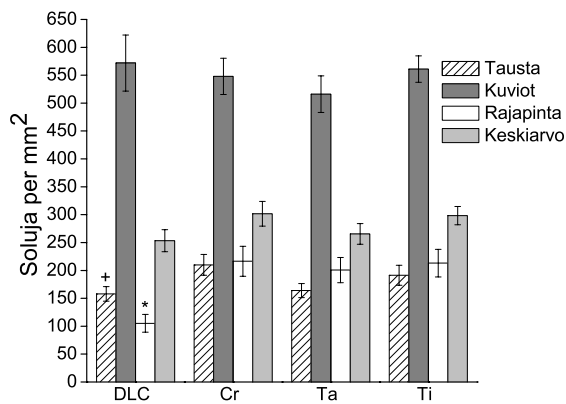
esiintyy tyypillisesti oksideina ja piidioksidit (mitä piikiekon pinta käytännössä usein on) ovat kudoksille haitallisia (22,23), mikä rajoittaa niiden käyttöä elimistössä. Tässä työssä oletimme, että piikiekkojen soluyhteensopivuutta voitaisiin parantaa paitsi pinnoittamalla pinta kokonaan (24–27), myös pinnoittamalla pinta osittain jollain bioyhteensopivalla materiaalilla. Hypoteesi todistettiin ja osoitettiin, että pinnan pinnoittaminen kokonaan ei ole välttämätöntä, jotta solujen adheesiota ja levittäytymistä voidaan parantaa. Piitausta ei haitannut solujen tarttumista biomateriaalikuvioidella, joita pii ympäröi kaikkialta.

Pinnoituksen avulla pinnan bioyhteensopivuus parani. Lisäksi kuvioiden vaikutukset solujen muotoon ja kokoon olivat mielenkiintoisia. Kuvioiden muoto, neliö tai ympyrä, sekä reunat vaikuttivat solujen muotoon. Koska solut suosivat biomateriaalipintaa ja välttivät piipintaa, ne asettautuivat jossain määrin epäluonnolliseen geometriseen muotoon. Lisäksi vinkuliiniposiiviset adheesioliitokset ja aktiinitukirangan järjestäytyminen osoittivat, että piitaustalla solut eivät adheroituneet, mutta biomateriaalipinnalla solut tarttuivat hanakasti alustaansa suosien kuvioiden reunoja. Luultavasti korkeusero (200 nm) kuvioiden ja taustan välillä tarjosi soluille hyvän tarttumispinnan sitoen solut tiukasti alustaansa.

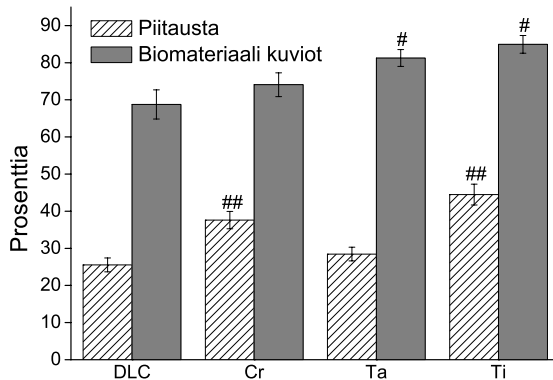
Kiinnostavaa oli, että kuvioiden koolla ja etäisyydellä voidaan monipuolisesti ohjata solujen integroitumista. Tämä osoitettiin kolmella eri tavalla. Suurilla kuvioilla, joille mahtui monta solua, solut selvästi suosivat biomateriaalia ja asettautuivat kuvioiden mukaiseen muotoon. Keskikokoisilla kuvioilla biomateriaalin suosiminen näkyi eri tavalla. Kuviot olivat suhteellisen pieniä, jolloin solujen täytyi ahtautua pienen tilaan. Solujen muoto ei enää heijastellut yhtä selvästi neliöiden tai ympyrän muotoja. Koska biomateriaalipinnan prosentuaalinen osuus pidettiin samana, olivat keskikokoiset kuviot melko lähellä toisiaan, esim. ympyrät vain 15 μm päässä toisistaan. Tämä johti kahteen erilliseen havaintoon. Solut asettautuivat kuvioiden päälle ja yrittivät muodostaa suoria solu-solu-kontakteja (28) kurkottelemalla toisiaan kohti piitaustan yli. Havaittiin myös, että yksi solu saattoi valloittaa kaksi tai useampaakin kuviota, jolloin solun muoto venähti tai muuttui tähtimäiseksi. Myös pienillä kuvioilla voitiin osoittaa, että solut suosivat biomateriaalia, vaikka kuviot olivat niin pieniä, että edes yksittäinen solu ei mahtunut niille. Solu peitti useita pieniä kuvioita, mutta solun filopodit selvästi suosivat soluyhteensopivaa biomateriaalipintaa ja välttelivät



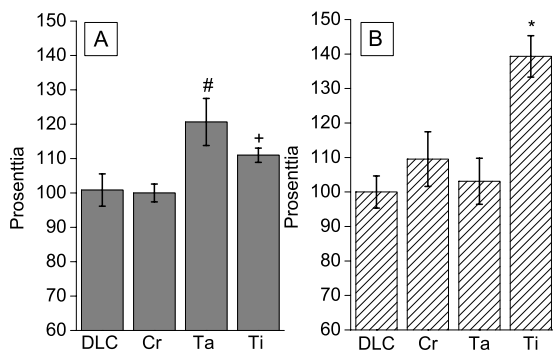
Kuva 6. 120 tunnin kasvatuksen jälkeen SaOS-2 solut muodostivat lähes konfluentin solukerroksen (paneeli A, kuva valittiin siten, että keskikokoiset kuviot voidaan vielä nähdä). Suurilla kuvioilla ohjausvaikutus oli kuitenkin vielä havaittavissa, paneelissa B on suuria piikuvioita titaanitaustalla. Homogeenisella (kuvioimattomalla) titaantipinnalla (suuri neliö kuvan keskellä) melkein kaikki solut olivat irronneet (paneeli C). Kuvan reunalla näkyy muuta pintaa, jonne solut ovat tarttuneet. Mittajana on 500 μm .



Kuva 7. SaOS-2 solujen tiheys oli biomateriaalikuviolla merkittävästi suurempi kuin piitaustalla ($p < 0.000000001$). Timanttinäytteillä soluja oli vähemmän piitaustalla kuin krominäytteiden piitaustalla (+) ja lisäksi timanttikuvioiden rajapinnalla soluja oli vähemmän kuin muiden kuvioiden rajapinnoilla (*).



Kuva 8. SaOS-2 solut peittivät prosentuaalisesti suuremman osan biomateriaalikuviosta kuin piitaustasta kaikilla näytteillä ($p < 0,000000001$). Titaani- ja tantaalikuviosta prosentuaalisesti suurempi osa oli peittyneenä kuin timantti- ja kromikuviosta (#) ja titaani- ja krominäytteiden piitaustasta oli suurempi osa peittyneenä kuin timantti- ja tantaalinäytteiden piitaustasta (##)



Kuva 9. SaOS-2 solujen suhteellinen koko biomateriaalikuviolla (paneeli A) ja piitaustalla (paneeli B) normalisoituna pienimpiin soluihin (kromi 100 % paneeli A:ssa ja timantti paneeli B:ssä). Solujen koko tantaalikuviolla oli suurempi kuin timantilla ja kromilla (#) ja suurempi titaanilla kuin kromilla (+). Piitaustalla solut olivat suurimpia titaaninäytteiden taustalla verrattaessa muiden materiaalien piitaustaan (*).

piipintaa. Pintojen ohjausvaikutus vahvistettiin yllä-
kuvatuilla mikroskooppikuvista tehdyillä havainnoilla
ja myös kvantitatiivisesti ja tilastollisesti.

120 tunnin kasvatuksen jälkeen solut olivat levit-
täytyneet myös piille ja muodostaneen konfluentin
solukerroksen. Tämä viittaa siihen, että jo osittaisel-
la pinnoituksella voidaan parantaa bioMEMS-laittei-
den soluyhteensopivuutta ja luultavasti edistää niiden
integroitumista kudokseen kriittisessä alkuvaiheessa.
Liukoiset kasvutekijät sekä suorat solu-solu kontak-
tit, joita soluystävällisellä biomateriaalipinnalla kas-
vavat solut tuottavat, saattavat edistää implantin in-
tegraatiota. Tähän viittaa merkittävät erot piitaustalla
kasvaneiden solujen peittävydessä ja koossa. Esimer-
kiksi sekä solujen peittävyys että koko olivat suurem-
pia titaaninäytteiden piitaustalla kuin muiden näyttei-
den piitaustalla. Potentiaalinen etu solujen nopeasta
integraatiosta liittyy infektorisikiin, joka on aina ole-
massa implantoitaessa jotain ihmiseen. Laitteen pin-
nan nopea peittyminen soluilla suojaa implanttia bak-
teeriadheesiota ja biofilmiin muodostumista vastaan
(29,30).

Tässä tutkimuksessa keskityttiin piipintoihin, jot-
ka kuvioitiin metalleja tai timanttia käyttäen. Tämän-
tyyppisiä pintoja ei ole tutkittu kovin paljoa, mutta sa-
manlaisia havaintoja on tehty muilla pinnoilla. Solun
orientaatiota on tyypillisesti tutkittu pinnoilla, joissa
on pitkittäisiä uria, jolloin solut asettautuvat urien
suuntaisesti (27,31–38). Aikaisemmissa tutkimuksissa
on myös havaittu pinnan topografian vaikuttavan so-
lujen muotoon (11–12, 39–43).

Luusoluja ja kuvioituja piipintoja on tutkittu ai-
kaisemmin lähinnä polymeeripinnoilla. Lisäksi on jon-
kin verran tutkimuksia piipinnoista, jotka on kuvioitu
kullalla, mutta näillä pinnoilla on usein vielä erillinen
adheesiivinen pinnoite kullalla (esim. fibronectiini) ja
soluja hylkivä pinnoite piillä (esim. polyetyleenigly-
koli; 17,44,45). Polymeerikuvioitutumuksissa on ha-
vaittu esimerkiksi, että säännöllisellä nanokuvioinnilla
voidaan vähentää solujen adheesiota ja levittäytymistä
(11–12,14) ja että mikrokuvioinnilla voidaan ohjata
solujen tarttumista kuvioihin (15,16). DLC:llä kuvi-
oituja piipintoja on tutkittu yhdessä tutkimuksessa ja
siinä osoitettiin, että neuronien kasvua voidaan ohjata
kuvioimalla erilaisia timanttipintoja (DLC, oksidoitu
DLC ja fosforidoupattu DLC; 18).

Aikaisemmista tutkimuksista kenties mielen-
kiintoisin käsitteli titaanilla kuvioitujen piipinto-
jen vaikutusta ihmisen osteosarkoomasoluihin (27).
Tutkimuslähtökohta oli samankaltainen kuin täs-

sä tutkimuksessa, mutta koko piipinta oli pinnoitet-
tu titaanilla, jota oli kuvioitu. Tutkimuksen tulokset
olivat yhdensuuntaiset omien havaintojemme kanssa;
bioyhteensopivuus parani ja solujen orientaatiota voi-
tiin ohjata. Lisäksi tutkimuksessa havaittiin, että aktii-
nisäikeet asettautuivat urien suuntaisesti ja fokaaliad-
heesiot olivat harjanteilla. Meidän havaintomme oli,
että topografisen ohjauksen lisäksi myös materiaalike-
mian avulla voidaan ohjata adheesioliitosten muodos-
tumista.

Omassa aiemmassa tutkimuksessamme, joka kä-
sitteli samanlaisia kuvioituja pintoja (kuten kuvassa
1 C) ja mesenkymaalisia kantasoluja (46), havaittiin
samanlaista biomateriaalin suosimista ja piin välttä-
mistä. Nykyisessä tutkimuksessa uusi havainto oli ti-
lastollisesti merkittävä ero solujen koossa piitaustalla,
riippuen siitä, mitä materiaalia näytteelle oli pinnoi-
tettu.

Työhypoteesi todistettiin osoittamalla, että jo osit-
taisella timantti- metallipinnoitteella voidaan parantaa
bioMEMS-alustojen soluyhteensopivuutta. Pinnan
kemiallisen koostumuksen lisäksi kuvioiden muoto,
koko ja reunat (korkeus) vaikuttavat soluyhteensopi-
vuuteen.

Kirjallisuus

1. Boyan BD, Hummert TW, Dean DD, Schwartz Z: Role of ma-
terial surfaces in regulating bone and cartilage cell response.
Biomaterials. 1996;17:137–146.
2. Healy KE, Thomas CH, Reznia A, Kim JE, McKeown PJ, Lom
B, ym: Kinetics of bone cell organization and mineralization
on materials with patterned surface chemistry. *Biomaterials*.
1996;17:195–208.
3. Keselowsky BG, Collard DM, Garca AJ: Surface chemistry mo-
dulates fibronectin conformation and directs integrin binding
and specificity to control cell adhesion. *J Biomed Mater Res A*.
2003;66:247–259.
4. Flemming RG, Murphy CJ, Abrams GA, Goodman SL, Nealey
PF: Effects of synthetic micro- and nano-structured surfaces on
cell behavior. *Biomaterials*. 1999;20:573–588.
5. van Kooten TG, Whitesides JF, von Recum A: Influence of sili-
cone (PDMS) surface texture on human skin fibroblast prolifera-
tion as determined by cell cycle analysis. *J Biomed Mater Res*.
1998;43:1–14.
6. Chen CS, Mrksich M, Huang S, Whitesides GM, Ingber DE: Geo-
metric control of cell life and death. *Science*. 1997;276:1425–
1428.
7. Thomas CH, Collier JH, Sfeir CS, Healy KE: Engineering gene
expression and protein synthesis by modulation of nuclear
shape. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99:1972–1977.
8. Falconnet D, Csucs G, Grandin HM, Textor M: Surface engi-
neering approaches to micropattern surfaces for cell-based
assays. *Biomaterials*. 2006;27:3044–3063.

9. Grayson ACR, Shawgo RS, Johnson AM, Flynn NT, Li Y, Cima MJ, ym: A BioMEMS review: MEMS technology for physiologically integrated devices. *IEEE J PROC.* 2004;92:6–21.
10. Voskerician G, Shive MS, Shawgo RS, von Recum H, Anderson JM, Cima MJ, ym: Biocompatibility and biofouling of MEMS drug delivery devices. *Biomaterials* 2003;24:1959–1967.
11. Biggs MJP, Richards RG, Gadegaard N, Wilkinson CDW, Dalby MJ: Regulation of implant surface cell adhesion: characterization and quantification of S-phase primary osteoblast adhesions on biomimetic nanoscale substrates. *J Orthop Res.* 2007;25: 273–282.
12. Biggs MJP, Richards RG, Gadegaard N, Wilkinson CDW, Dalby MJ: The effects of nanoscale pits on primary human osteoblast adhesion formation and cellular spreading. *J Mater Sci Mater Med.* 2007;18:399–404.
13. Hart A, Gadegaard N, Wilkinson CDW, Oreffo ROC, Dalby MJ: Osteoprogenitor response to low-adhesion nanotopographies originally fabricated by electron beam lithography. *J Mater Sci Mater Med.* 2007;18:1211–1218.
14. Kunzler TP, Huwiler C, Drobek T, Vrs J, Spencer ND: Systematic study of osteoblast response to nanotopography by means of nanoparticledensity gradients. *Biomaterials.* 2007;28:5000–5006.
15. Hanein Y, Pan YV, Ratner BD, Denton DD: Micromachining of nonfouling coatings for bio-MEMS applications. *Sensors and Actuators B.* 2001;81:49–54.
16. Owen GR, Jackson J, Chehroudi B, Burt H, Brunette DM: A PLGA membrane controlling cell behaviour for promoting tissue regeneration. *Biomaterials.* 2005;26: 7447–7456.
17. Berry CC, Curtis ASG, Oreffo ROC, Agheli H, Sutherland DS: Human fibroblast and human bone marrow cell response to lithographically nanopatterned adhesive domains on protein rejecting substrates. *IEEE Trans Nanobioscience.* 2007;6:201–209.
18. Kelly S, Regan EM, Uney JB, Dick AD, McGeehan JP, Group BB, ym: Patterned growth of neuronal cells on modified diamond-like carbon substrates. *Biomaterials.* 2008;29:2573–2580.
19. Lappalainen R, Anttila A, Heinonen H: Diamond coated total hip replacements. *Clin Orthop Relat Res.* 1998;352:118–127.
20. Santavirta S, Takagi M, Gmez-Barrena E, Nevalainen J, Lassus J, Salo J, ym: Studies of host response to orthopedic implants and biomaterials. *J Long Term Eff Med Implants.* 1999;9:67–76.
21. Levon J, Myllymaa K, Kouri VP, Rautemaa R, Kinnari T, Myllymaa S, ym: Biomateriaalien bakteeridheesio vastustuskyky: tantaali, titaani ja kromi verrattuna timantinkaltaiseen hiileen. *Suom Ortop Traumat.* 2008;31:290–295.
22. Hench LL, Wilson J: Biocompatibility of silicates for medical use. *Ciba Found Symp.* 1986;121: 231–246.
23. Liu X, Fu RKY, Poon RWY, Chen P, Chu PK, Ding C: Biomimetic growth of apatite on hydrogen-implanted silicon. *Biomaterials.* 2004;25:5575–5581.
24. Velten T, Ruf HH, Barrow D, Aspragathos N, Lazarou P, Jung E, ym: Packaging of bio-MEMS: strategies, technologies, and applications. *IEEE J ADVP.* 2005;28:533–546.
25. Bogner E, Dominizi K, Hagl P, Bertagnolli E, Wirth M, Gabor F, ym: Wanzenboeck HD: Bridging the gap—biocompatibility of microelectronic materials. *Acta Biomater.* 2006;2:229–237.
26. Bouaidat S, Berendsen C, Thomsen P, Petersen SG, Wolff A, Jonsmann J: Micro patterning of cell and protein non-adhesive plasma polymerized coatings for biochip applications. *Lab Chip.* 2004;4:632–637.
27. Mwenifumbo S, Li M, Chen J, Beye A, Soboyejo W: Cell/surface interactions on laser micro-textured titanium-coated silicon surfaces. *J Mater Sci Mater Med.* 2007;18: 9–23.
28. Civitelli R, Beyer EC, Warlow PM, Robertson AJ, Geist ST, Steinberg TH: Connexin43 mediates direct intercellular communication in human osteoblastic cell networks. *J Clin Invest.* 1993;91:1888–1896.
29. Gristina AG: Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration. *Science.* 1987;237:1588–1595.
30. Subbiahdoss G, Kuijter R, Grijpma DW, van der Mei HC, Busscher HJ: Microbial biofilm growth vs. tissue integration: "the race for the surface" experimentally studied. *Acta Biomater.* 2009;5:1399–1404.
31. Curtis A, Wilkinson C: Topographical control of cells. *Biomaterials.* 1997;18:1573–1583.
32. Ber S, Torun Köse G, Hasirci V: Bone tissue engineering on patterned collagen films: an in vitro study. *Biomaterials.* 2005;26:1977–1986.
33. Brunette DM, Kenner GS, Gould TRL: Grooved titanium surfaces orient growth and migration of cells from human gingival explants. *J Dent Res.* 1983;62:1045–1048.
34. Chou L, Firth JD, Uitto VJ, Brunette DM: Effects of titanium substratum and grooved surface topography on metalloproteinase-2 expression in human fibroblasts. *J Biomed Mater Res.* 1998;39:437–445.
35. Chou L, Firth JD, Uitto VJ, Brunette DM: Substratum surface topography alters cell shape and regulates fibronectin mRNA level, mRNA stability, secretion and assembly in human fibroblasts. *J Cell Sci.* 1995;108:1563–1573.
36. Dalby MJ, Riehle MO, Sutherland DS, Aghelil H, Curtis ASG: Use of nanotopography to study mechanotransduction in fibroblasts - methods and perspectives. *Eur J Cell Biol.* 2004;83:159–169.
37. Loesberg WA, te Riet J, van Delft FCMJM, Schön P, Figdor CG, Speller S, ym: The threshold at which substrate nanogroove dimensions may influence fibroblast alignment and adhesion. *Biomaterials.* 2007;28: 3944–3951.
38. Teixeira AI, Abrams GA, Bertics PJ, Murphy CJ, Nealey PF: Epithelial contact guidance on well-defined micro- and nanostructured substrates. *J Cell Sci.* 2003;116:1881–1892.
39. Britland S, Morgan H, Wojciak-Stodart B, Riehle M, Curtis A, Wilkinson C: Synergistic and hierarchical adhesive and topographic guidance of BHK cells. *Exp Cell Res.* 1996;228:313–325.
40. Ingber DE: Fibronectin controls capillary endothelial cell growth by modulating cell shape. *Proc Nat Acad Sci.* 1990;87:3579–3583.
41. den Braber ET, de Ruijter JE, Ginsel LA, von Recum AF, Jansen JA: Quantitative analysis of fibroblast morphology on microgrooved surfaces with various groove and ridge dimensions. *Biomaterials.* 1996;17:2037–2044.
42. Singhvi R, Kumar A, Lopez GP, Stephanopoulos GN, Wang DC, Whitesides GM, ym: Engineering cell shape and function. *Science.* 1994;264:696–698.

43. Biggerelle M, Anselme K, Noël B, Ruderman I, Hardouin P, Iost A: Improvement in the morphology of Ti-based surfaces: a new process to increase in vitro human osteoblast response. *Biomaterials*. 2002;23:1563–1577.
44. Lan S, Veiseh M, Zhang M: Surface modification of silicon and gold patterned silicon surfaces for improved biocompatibility and cell patterning selectivity. *Biosens Bioelectron*. 2005;20:1697–1708.
45. Veiseh M, Wickes BT, Castner DG, Zhang M: Guided cell patterning on gold-silicon dioxide substrates by surface molecular engineering. *Biomaterials*. 2004;25:3315–3324.
46. Myllymaa A, Kaivosoja E, Myllymaa K, Sillat T, Korhonen H, Lappalainen R, ym: Adhesion, spreading and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells cultured on micropatterned amorphous diamond, titanium, tantalum and chromium coatings on silicon. *J Mater Sci: Mater Med*. 2009; painossa.