

MATERIAŁY POLIMEROWE I WĘGLOWE W ASPEKcie ZASTOSOWANIA JAKO MATERIAŁ KONSTRUKCYJNY DYSKU POLSKIEJ MECHANICZNEJ ZASTAWKI SERCA - OCENA WYBRANYCH WŁASNOŚCI FIZYCZNYCH I BIOLOGICZNYCH

AGNIESZKA SZUBER^{1*}, MAGDALENA KOŚCIELNIAK-ZIEMNIAK¹, KAROLINA JANICZAK¹, MACIEJ GŁOWACKI¹, MACIEJ GAWLIKOWSKI¹, ROMAN KUSTOSZ¹, MAŁGORZATA GONSIOR¹, PIOTR WILCZEK¹, STANISŁAW DUBER², WITOLD KACZOROWSKI³, PIOTR NIEDZIELSKI³, JACEK GRABARCZYK³, WITOLD WALKE⁴

¹ FUNDACJA ROZWOJU KARDIOCHIRURGII, PRACOWNIA SZTUCZNEGO SERCA, UL. WOLNOŚCI 345A, 41-800 ZABRZE

² UNIWERSYTET ŚLĄSKI, WYDZIAŁ NAUK O ZIEMI, UL. BĘDZIŃSKA 60, 41-200 SOSNOWIEC

³ POLITECHNIKA ŁÓDZKA, INSTYTUT INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ, UL. STEFANOWSKIEGO 1/15, 90-924 ŁÓDŹ

⁴ POLITECHNIKA ŚLĄSKA, WYDZIAŁ INŻYNIERII BIOMEDYCZNEJ, UL. GEN. CHARLESA DE GAULLE'A 72, 41-800 ZABRZE

* E-MAIL: ASZUBER@FRK.PL

Streszczenie

Badania biomateriałów polimerowych i węglowych prowadzone są w celu doboru odpowiednich materiałów konstrukcyjnych dla polskiej dyskowej mechanicznej zastawki serca typu Moll. W obszarze zainteresowania znalazły się: polietereteroketon (PEEK), PEEK utwardzony powierzchniowo warstwą węglową typu DLC oraz węgiel szklisty. Biomateriały zostały poddane wybranym badaniom strukturalnym (badaniom mikrotwardości metodą Vickersa i porowatości z wykorzystaniem analizatora Autosorb iQ) oraz badaniom własności mechanicznych na stanowisku badań zmęczeniowych. Własności biogodne biomateriałów oceniono wykorzystując nowoczesną metodę badań biologicznych biomateriałów - badania trombogenności powierzchni wykonano na urządzeniu Impact-R, w testach dynamicznego kontaktu z krwią w warunkach oddziaływania sił ścinających.

Wyniki badań zmęczeniowych i oceny trombogenności materiałów polimerowych potwierdziły właściwe zastosowanie materiału PEEK w konstrukcji dysku zastawki mechanicznej przeznaczonej do stosowania krótkoterminowego (około 12 miesięcy) w pozaustrojowej pulsacyjnej pompie mechanicznego wspomaganie serca. Zastosowanie utwardzającej powłoki węglowej typu DLC na polimerze stanowi właściwy kierunek prac mających na celu uzyskanie bardziej wytrzymałej powierzchni dysku w kontakcie z tytanowym pierścieniem zastawek, co potwierdziły testy zmęczeniowe. Przeprowadzone badania mikrotwardości biomateriałów wskazały wysoką wytrzymałość oraz twardość opracowywanego węgla szklistego.

Słowa kluczowe: dysk mechanicznej zastawki serca, biomateriały, biogodność, mechaniczne wspomaganie serca

[Inżynieria Biomateriałów 121 (2013) 25-32]

POLYMERIC AND CARBON MATERIALS APPLIED IN THE CONSTRUCTION OF POLISH MECHANICAL VALVE DISK – EVALUATION OF SELECTED PHYSICAL AND BIOLOGICAL PROPERTIES

AGNIESZKA SZUBER^{1*}, MAGDALENA KOŚCIELNIAK-ZIEMNIAK¹, KAROLINA JANICZAK¹, MACIEJ GŁOWACKI¹, MACIEJ GAWLIKOWSKI¹, ROMAN KUSTOSZ¹, MAŁGORZATA GONSIOR¹, PIOTR WILCZEK¹, STANISŁAW DUBER², WITOLD KACZOROWSKI³, PIOTR NIEDZIELSKI³, JACEK GRABARCZYK³, WITOLD WALKE⁴

¹ FOUNDATION OF CARDIAC SURGERY DEVELOPMENT, WOLNOSCI 345A STR, 41-800 ZABRZE, POLAND

² UNIVERSITY OF SILESIA, DEPARTMENT OF EARTH SCIENCE, BĘDZIŃSKA 60 STR, 41-200 SOSNOWIEC, POLAND

³ LODZ UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, INSTITUTE OF MATERIALS ENGINEERING, STEFANOWSKIEGO 1/15 STR., 90-924 LODZ, POLAND

⁴ SILESIAN UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING, GEN. CHARLESA DE GAULLE'A 72 STR, 41-800 ZABRZE, POLAND

* E-MAIL: ASZUBER@FRK.PL

Abstract

The polymeric and carbon biomaterials tests are performed in order to select the proper constructional materials for Polish mechanical tilting valve type Moll. In the area of interests are: polyetheretherketone (PEEK), PEEK with a DLC (diamond like carbon) surface layer and glassy carbon. The biomaterials were analyzed in selected structural tests (micro hardness tests utilizing Vickers method and porosity tests utilizing Autosorb iQ analyzer) and mechanical properties investigation on the fatigue test stand. Biocompatibility properties of biomaterials were evaluated utilizing new biological investigation method – biomaterial surface thrombogenicity test performed using Impact-R device, in the dynamic blood contact conditions with shear stress impact.

The results of fatigue and thrombogenicity tests of polymeric materials confirmed the proper PEEK use in the mechanical valve disk construction dedicated for short term application (approximately 12 months) in the extracorporeal pulsatile ventricular heart assists device. The hardened carbon type DLC surface layer on the polymer is the appropriate direction of investigation in order to obtain more durable disk surface in the contact with titanium valve housing, what was confirmed in fatigue tests. The micro hardness biomaterials tests showed high strength and hardness of investigated glassy carbon.

Keywords: mechanical heart valve disc, biomaterials, biocompatibility, mechanical heart support

[Engineering of Biomaterials 121 (2013) 25-32]

Niewydolność serca w ciągu ostatnich lat stanowi znaczący i rosnący problem współczesnej kardiologii. W grupie pacjentów ze skrajną niewydolnością serca (IV NYHA) transplantacja serca jest nadal „złotym standardem” w leczeniu. Ze względu na ograniczoną dostępność narządów możliwości medycyny transplantacyjnej są ograniczone. Sytuacja ta stymuluje rozwój nauki w kierunku alternatywnych metod leczenia jakim są między innymi mechaniczne protezy serca [1]. Trwające już ponad 20 lat prace w Pracowni Sztucznego Serca w Zabrze zaowocowały powstaniem pozaustrojowych pomp mechanicznego wspomaganie serca. Stosowana dotychczas w klinikach proteza POLVAD-MEV wyposażona jest w komercyjne jednodyskowe zastawki przeznaczone do stosowania w leczeniu wad zastawkowych. Mając na uwadze, iż dostępne na rynku zastawki dyskowe nie do końca sprawdzają się w konstrukcji pozaustrojowych pulsacyjnych pomp wspomaganie serca ze względu na duże elementy podtrzymujące dysk stojące w strudze przepływającej krwi, zwiększające ryzyko hemolizy i wykrzepiania, w ramach projektu „Polskie Sztuczne Serce” Instytut Maszyn Przepływowych Politechniki Łódzkiej opracował innowacyjną konstrukcję zastawek typu Moll. Nowa zastawka bazująca na projekcie prof. J. Molla (Moll J.J. patent USA 4.661.106, 1987; Moll J.J. patent USA 4.725.275, 1987) charakteryzuje się bardzo małymi i umiejscowionymi blisko pierścienia zastawki elementami podtrzymującymi dysk, dzięki czemu strumień krwi przepływający przez zastawkę nie jest zaburzany [2]. Zastawka typu Moll jest przeznaczona do stosowania w nowej pulsacyjnej pozaustrojowej pompie mechanicznego wspomaganie serca typu ReligaHeart EXT [3].

Z uwagi na ryzyko powikłań zatorowo zakrzepowych występujących podczas mechanicznego wspomaganie serca [4,5], niezwykle ważnym aspektem konstrukcyjnym zastawki jest dobór odpowiednich materiałów na pierścień i dysk zastawki. Podczas wieloletnich badań sprecyzowano wymagania, jakimi powinny charakteryzować się materiały stosowane w zastawkach mechanicznych: wywoływanie możliwie najmniejszych zaburzeń czynnościowych elementów morfotycznych krwi oraz tkanki śródbłonkowej otaczającej zastawkę, odporność na zużycie mechaniczne i strukturalne, minimalizowanie zjawiska odkładania się zakrzepów, nieuleganie degradacji w środowisku fizjologicznym, nieabsorbowanie składników krwi ani nieuwalnianie składników obcego pochodzenia do krwiobiegu, podatność na obróbkę technologiczną (szczególnie sterylizację za pomocą odpowiednich procesów), właściwe wykończenie powierzchni [4].

W latach 1987-1989 prowadzono badania pierwszego prototypu zastawki typu Moll, który składał się z pierścienia wykonanego ze stopu odlewniczego stellite i dysku wytworzonego z węgla pirolitycznego w procesie pirolizy na rdzeniu grafitowym. Ze względu na ówczesne ograniczenia technologiczne, badania prototypu wykazały niską wytrzymałość dysku na naprężenia zginające – warstwa węgla ulegała pękaniu. W kolejnym prototypie dysk zastawki wytworzono z poliacetalu (Delrin), jednak długoterminowe badania zmęczeniowe wykazały ograniczoną odporność dysku na cykliczne naprężenia ze strony elementów podtrzymujących dysk w pierścieniu – zaobserwowano wytarcia i wyszczerbienia dysku [2].

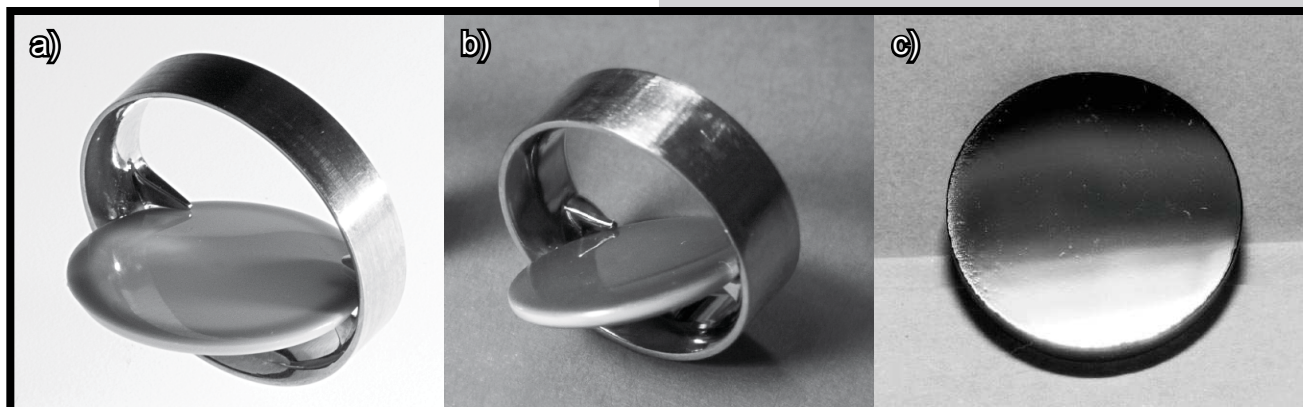
Bazę do wyboru właściwego materiału na dysk mechanicznej zastawki serca stanowił przegląd literaturowy dotyczący materiałów wykorzystywanych na pierścieniu i dyski mechanicznych zastawek serca stosowanych na świecie.

In recent years cardiac insufficiency is a significant and increasing problem of modern cardiology. The heart transplantation is still a “gold standard” in the treatment in a group of patients with end stage heart insufficiency (IV NYHA). Due to the limited availability of organs the capabilities of transplantation medicine are limited. The situation stimulates development of the alternative treatment methods, for example mechanical heart prostheses [1]. Lasting more than 20 years research works of the Artificial Heart Laboratory in Zabrze resulted in creation of an extracorporeal heart assist pump. The POLVAD MEV prosthesis is equipped with commercial mono disc valves designated to heart valve defect treatment. Taking into consideration that the mechanical valves available on the market are not the best option in the construction of extracorporeal pulsatile ventricular assist devices because of the big upholding disc elements crossing the blood stream, increasing the hemolysis and thrombus risk, within the “Polish Artificial Heart” project, the Institute of Turbo Machinery at the University of Technology in Lodz developed an innovative Moll valve construction. The new valve, based on the professor J. Moll project (Moll J.J. patent USA 4.661.106, 1987; Moll J.J. patent USA 4.725.275, 1987), is characterized by small and located close to the valve housing upholding disc elements, therefore the blood stream flowing through the valve is not disturbed [2]. The Moll valve is dedicated to the construction of a new pulsatile extracorporeal ventricular assist device ReligaHeart EXT [3].

Due to embolism and thrombus complications during mechanical heart support [4,5], extremely important constructional valve aspect is to select proper materials for valve housing and disc valve. During many years of research the mechanical heart valve prosthesis materials requirements were specified: causing minimal functional disorders of blood cell and endothelial tissue surrounding the valve, having mechanical and structural wear resistance, minimizing blood clots deposition, not degrading in the physiological environment, not absorbing blood components and not releasing foreign components to the blood stream, being suitable for technological processing (especially for sterilization using appropriate process), having appropriate surface modification [4].

In 1987-1989 the first prototype of Moll valve examinations were performed. The prototype consisted of Stellite (casting alloy) ring and pyrolytic carbon disc developed in the pyrolysis process on the graphite cord. Due to technological limitations in those days, the prototype investigation shown low disc resistance on the bend stress – the layer was broken. In the next prototype the valve disc was manufactured from polyacetal (Delrin), but long term fatigue tests showed limited disc resistance in the cycling stress of upholding disc elements – the disc damages were observed [2].

The literature review of valve housings and discs material construction applied worldwide was the basis of the appropriate biomaterial selection. Currently the predominant material for valve housing is titanium (Medtronic Hall, Sorin, Omniscience, Lillehei-Kaster, Ultracor Heart Valve, Wada-Cutter, Cooley-Cutter, Beall-Surgitool), and for the valve disc is Delrin (Björk-Shiley Delrin, Kay-Shiley), Teflon (Wada-Cutter), polyethylene (Chitra heart valve) and pyrolytic carbon (Medtronic Hall, Sorin Carbocast, Omnicarbon TM, Björk-Shiley Aortic Standard, Omniscience, Lillehei-Kaster, Ultracor Heart Valve, Cooley-Cutter, Beall-Surgitool) [6-8].



RYS. 1. a) Zastawka typu Moll z dyskiem z PEEK; b) zastawka typu Moll z dyskiem z PEEK pokrytym warstwą DLC; c) węgiel szklisty.

FIG. 1. a) Moll valve with PEEK disc; b) Moll valve with PEEK+DLC disc; c) glassy carbon.

Materiałem dominującym na pierścieniach zastawek aktualnie jest tytan (Medtronic Hall, Sorin Carbocast, Omniscience, Lillehei-Kaster, Ultracor, Wada-Cutter, Cooley-Cutter, Beall-Surgitool), a na dysk wykorzystywano Derlin (Björk-Shiley Delrin, Kay-Shiley), teflon (Wada-Cutter), politylen (Chitra) i najbardziej rozpowszechniony - węgiel pirolityczny (Medtronic Hall, Sorin Carbocast, Omnicarbon, Bjork-Shiley, Omniscience, Lillehei-Kaster, Ultracor, Cooley-Cutter, Beall-Surgitool) [6-8].

W niniejszej pracy badaniom poddano trzy materiały opracowywane do potencjalnego zastosowania na dyski polskich mechanicznych zastawek serca: polieteroeteroketon (PEEK), PEEK utwardzony powierzchniowo warstwą węglową typu DLC (DLC - diamond like carbon) i węgiel szklisty. Prototypy zastawek z dyskiem z polieteroeteroketonu (PEEK) opracowano w ramach programu „Polskie Sztuczne Serce” - RYS. 1a. Z uwagi na fakt, iż dyski polimerowe cechują się słabą odpornością na ścieranie [4] w kontakcie z tytanowym pierścieniem, co stanowi istotną przeszkodę do zastosowania takiej zastawki w leczeniu długoterminowym, dla zwiększenia wytrzymałości powierzchni polimerowego dysku zastawki podjęto próby wytworzenia atrombogenicznej warstwy powierzchniowej zwiększającej jego odporność na ścieranie. W ramach projektu rozwojowego pt. „Opracowanie typoszeregu dyskowych zastawek mechanicznych dla pediatrycznych komór wspomaganie serca”, opracowano metodę wytwarzania na powierzchni dysków z PEEKu warstwy węgla diamentopodobnego (DLC - diamond like carbon) - RYS. 1b. Równolegle prowadzone są prace nad wytworzeniem dysku z węgla szklistego w ramach projektu badawczego „Węglowy dysk dla zastawki mechanicznej dla polskich komór wspomaganie serca”, w którym opracowano metodę wytwarzania dysku o wysokiej twardości i niskiej porowatości z węgla szklistego (RYS. 1c).

Z uwagi na fakt, iż biochemiczna degradacja i mechaniczne zużycie są największymi problemami biomateriałów konstrukcyjnych mechanicznych zastawek serca, a nawet najmniejsze uszkodzenia powierzchni zastawki sprzyjają formowaniu się skrzepin [4], prace badawcze rozpoczęto od wykonania badań własności mechanicznych i strukturalnych oraz dokonania analizy potencjału trombogenicznego powierzchni wybranych rozwiązań materiałowych.

In this paper, three materials have been studied which were developed for the potential use in a Polish mechanical heart valve discs: polyetheretherketone (PEEK), PEEK with a hardened carbon type DLC (diamond like carbon) surface layer and glassy carbon. The valves prototypes with polyetheretherketone (PEEK) disc were developed within the “Polish Artificial Heart” project – FIG. 1a. Because of the fact, that polymeric discs are characterized by low wear resistance [4] in the contact with titanium housing which is a significant obstacle to use such valve in long term treatment, to increase the polymeric disc surface resistance the atrombogenic surface layer was developed to improve the disc wear resistance. Within the project “Development of mechanical valve series for pediatric ventricular assist device” the diamond-like carbon layer (DLC) on PEEK discs surface was developed - FIG. 1b. Simultaneously the research to obtain a glassy carbon disc was carried on as a part of the research project: “Mechanical valve carbon disc for Polish ventricular assist device” in which production method was developed to obtain the glass carbon valve disc characterized by high hardness and low porosity (FIG. 1c).

Due to the fact, the biochemical degradation and mechanical wear are the biggest problems of mechanical valves constructional biomaterials and even the smallest valve surface damage cause cloths formation [4], the research works began from mechanical and structural properties tests and evaluation of selected biomaterials surface thrombogenicity.

Materials and methods

Tested materials

1. PEEK Optima LT1® Invibio (analysis DSC (20°C/min.), $T_G = 146^\circ\text{C}$, $T_C = 292^\circ\text{C}$, $T_M = 341^\circ\text{C}$; density 1,31 g/cc) – biocompatible polymer available to use in long term implants (more than 30 days) [9];

2. PEEK Optima LT1® Invibio [9] with DLC layer developed utilizing the chemical vapor deposition in the plasma method, microwave and radiofrequency assisted (MW/RF-PACVD) [10];

3. Glassy carbon developed in 2 stages, in the first stage, a mixture of furfural alcohol and catalyst, a solution of 4-toluensulfonic acid in ethanol are subjected to polymerization in an aluminum mold at temperature of 130°C. So prepared solid material is removed from the mold and is subjected to mechanical machining to achieve a proper shape including contraction of this material occurring in the second stage of the preparation of glassy carbon – carbonization in an argon atmosphere up to 1000°C.

Badane materiały

1. PEEK Optima® Invbio (analiza DSC (20°C/min.), $T_g = 146^\circ\text{C}$, $T_c = 292^\circ\text{C}$, $T_m = 341^\circ\text{C}$; gęstość 1,31 g/cc) - biogodny polimer przeznaczony do stosowania na implanty długoterminowe (powyżej 30 dni) [9];

2. PEEK Optima® Invbio [9] z warstwą węgla diamentopodobnego (DLC) wytworzoną za pomocą metody chemicznego osadzania z fazy gazowej w obszarze plazmy wspomaganej częstotliwością mikrofalową i radiową (MW/RFPACVD) [10];

3. Węgiel szklisty wytwarzany dwuetapowo, w pierwszym etapie mieszanina alkoholu furfurylowego z katalizatorem w postaci roztworu kwasu 4-tolueno-sulfonowego w etanolu poddawana jest polimeryzacji w aluminiowych formach w temperaturze do 130°C, następnie lity materiał usuwany jest z form i poddawany obróbce mechanicznej dożądanego kształtu z uwzględnieniem skurczliwości występującej w wyniku drugiego etapu wytwarzania węgla szklistego - karbonizacji w atmosferze argonu do 1000°C.

Badania wybranych własności strukturalnych biomateriałów

Badania mikrotwardości metodą Vickersa zostały wykonane z wykorzystaniem mikrotwardościomierza DuraScan 50 firmy Struers. Pomiar przeprowadzono przy obciążeniu $HV_{0,01}$ (10 G) zarówno dla próbek polimerowych, jak i dla próbek z materiału węglowego. Wykonano po 10 pomiarów na zglądach wzdluznych i poprzecznych.

Próbki z materiału węglowego poddano badaniom porowatości. Badania przeprowadzono z wykorzystaniem analizatora Autosorb iQ firmy Quantachrome wraz z oprogramowaniem ASiQwin. Analizator posłużył do pomiaru adsorpcji i desorpcji na powierzchni ciała stałego z zastosowaniem określonej prędkości pary nasyconej i statycznej próby objętościowej. W przeprowadzonym badaniu jako adsorbant został użyty azot. Materiał przed badaniem wstępnie osuszono, rozkruszono i umieszczono w naczyniu pomiarowym. W pierwszej kolejności odgazowano próbki w temperaturze $T = 200^\circ\text{C}$, a następnie wyznaczono pełną izotermę adsorpcji w temperaturze ciekłego azotu ($T = -197^\circ\text{C}$). Na podstawie uzyskanych izoterm obliczono powierzchnię właściwą próbek metodą BET (Brunauer, Emmett, Teller) oraz wyznaczono rozkład porów metodą BJH (Barrett, Joyner, Halenda).

Badania wybranych własności mechanicznych biomateriałów

Dyski zastawek wykonane z PEEKu oraz PEEKu z warstwą węglową typu DLC poddano testom zmęczeniowym na stanowisku laboratoryjnym. Dynamiczny test zmęczeniowy polegał na ciągłej, cyklicznej pracy zastawki z zamontowanym dyskiem, wymuszonej przez strumień cieczy, o kontrolowanej amplitudzie ciśnienia oddziaływującej na dysk zastawki. Fala ciśnienia w części hydraulicznej generowana była przez system pneumatyczny, w którym zastosowany został elektrozawór, sprzężony membraną z częścią hydrauliczną. Cały układ badawczy zarządzany był przez dedykowany system kontrolno-pomiarowy zbudowany na bazie wielofunkcyjnych kart pomiarowych, komputera PC oraz oprogramowania sterującego - pomiarowego napisanego w środowisku LabVIEW.

Structural properties of biomaterials

The micro hardness examination by the Vickers method with the utilization of a micro hardness analyzer DuraScan 50 (Struers) was done. The measurements were performed at the load of $HV_{0,01}$ (10 G) for polymer and carbon material. Ten measurements were performed on longitudinal and transverse micro sections.

Porosity examination was conducted for the carbon samples. The test was performed with the utilization of Autosorb iQ (Quantachrome) analyzer with ASiQwin program. The analyzer was used for adsorption and desorption analysis on solid surfaces with the utilization of a specific resilience of saturated steam and static volume test. In this examination nitrogen was used as an adsorbent. The material before examination was dried, crushed and placed in a measuring vessel. First, the samples were degassed at 200°C , and afterwards, full adsorption isotherm at liquid nitrogen temperature (-197°C) was set. On the basis of the obtained isotherm the specific surface area was calculated by the BET (Brunauer, Emmett, Teller) method and the pore distribution by BJH (Barrett, Joyner, Halenda) method.

Mechanical properties of biomaterials

Fatigue tests of PEEK and PEEK with carbon layer DLC discs were done on a special laboratory stand. The dynamic fatigue test consisted in permanent, cyclic valve work, generated by fluid flow controlled by pressure amplitude interacting with the valve disc. Pressure wave in the hydraulic part is generated by a pneumatic system in which an electro valve was coupled with a membrane in the hydraulic part. The whole laboratory stand was managed by a dedicated measurement and control system on the basis of multifunctional data acquisition cards, computer, control and measurement software written in the Lab View. The following parameters during the fatigue test were applied: valve closing pressure difference: fixed at 10 kPa (pressure difference measured before and behind the valve during normal work in a ventricular assist device is up to 7 kPa), valve operating frequency: 8 Hz - 480 beat per minute (typical frequency of valve work in a ventricular assist device is 1.3 Hz (80 bpm), temperature of the hydraulic fluid: $37 \pm 2^\circ\text{C}$, duration of the experiment - 60 days (equivalent of one year work simulation).

Thrombogenicity of biomaterials

All mentioned above materials underwent the surface thrombogenicity assessment with the utilization of Impact R test [11-13]. Biomaterial samples were prepared in accordance with the requirements of the Impact R test method, in the form of 14.4 mm diameter discs. Before examination, the samples were sterilized with ethylene oxide. The test was performed in dynamic conditions where blood flow above the investigated surface with a determined speed and in defined period of time. The test conditions simulated physiological blood flow at the wall of medium-sized arteries. Polystyrene was the reference material, recommended by device producer as simulating the surface with the most similar conditions to arterial vessels wall area. After the experiment, selected parameters were determined:

- activation of selected cell receptors in the blood cells after contact with biomaterials surface - in examinations utilizing flow cytometry (Beckman Coulter),
- number of adhered blood cells with active receptors on the biomaterials surface after blood contact - in examinations utilizing fluorescence microscopy (Carl Zeiss).

Podczas badań zmęczeniowych zastosowano następujące parametry testu: różnica ciśnień domykająca dysk zastawki na stanowisku zmęczeniowym: do 10 kPa (różnica ciśnień przed i za zastawką w trakcie normalnej pracy zastawki w komorze wynosi do 7 kPa), częstotliwość pracy zastawki na stanowisku zmęczeniowym: 8 Hz - 480 uderzeń na minutę (typowa częstotliwość zastawki w trakcie normalnej pracy w komorze wynosi 1,3 Hz - 80 uderzeń na minutę), temperatura cieczy hydraulicznej: $37 \pm 2^\circ\text{C}$, czas trwania eksperymentu - 120 dni (symulacja dwóch lat pracy zastawki).

Badania trombogenności powierzchni biomateriałów

Wszystkie biomateriały poddano ocenie trombogenności powierzchni z wykorzystaniem testu IMPACT-R [11-13]. Próbkę biomateriałów do badań przygotowano zgodnie z określonymi wymogami zastosowanej techniki badawczej IMPACT-R, materiały badano w postaci krążków o średnicy 14,4 mm. Próbkę przed eksperymentem poddano procesowi sterylizacji tlenkiem etylenu. Testy prowadzono w warunkach dynamicznych wprowadzając krew w ruch wirowy z określoną prędkością obrotową nad powierzchnią próbek badanych (w określonym czasie). Warunki eksperymentu modelują warunki fizjologiczne przepływu krwi przy ścianie średnich naczyń tętniczych. Materiałem referencyjnym był polistyren, materiał wskazany przez producenta urządzenia pomiarowego jako symulujący powierzchnię o warunkach najbardziej zbliżonych do fizjologicznych w pobliżu ściany naczyń tętniczych. Po przeprowadzeniu doświadczenia oceniano:

- aktywność wybranych receptorów komórkowych we krwi po kontakcie z powierzchnią biomateriałów - w badaniu z zastosowaniem cytometrii przepływowej (Beckman Coulter),
- liczbę zaadherowanych komórek krwi z aktywnymi receptorami na powierzchni biomateriałów po kontakcie z krwią - w badaniu z zastosowaniem mikroskopu fluorescencyjnego (Carl Zeiss).

Wyniki i dyskusja

Badania mikrotwardości i zmęczeniowe materiałów polimerowych

Badania mikrotwardości próbek polimerowych wykazały, iż twardość czystego PEEKu kształtowała się na poziomie $27 \text{ HV}_{0,01}$, a dla próbek z naniesioną warstwą DLC wynosiła $35 \text{ HV}_{0,01}$. Ze względu na małą liczebność próbek i niezny charakter rozkładu zmiennej losowej zastosowano nieparametryczny test rangowanych sum Wilcozona. Wynik statystyki testowej $p = 0,00655$ jest mniejszy od przyjętego poziomu istotności $p = 0,05$, a zatem miary skupienia zmiennej losowej w badanych grupach nie są równe.

Dyski zastawek z PEEKu niemodyfikowanego powierzchniowo i z warstwą węglową typu DLC poddano testom zmęczeniowym na stanowisku laboratoryjnym. Dyski z powłokami diamentopodobnymi charakteryzowały się większą odpornością na ścieranie niż dyski wykonane z niemodyfikowanego materiału PEEK. Po 120 dniach testu zmęczeniowego, odpowiadającego dwóm latom pracy zastawek w typowych warunkach i z typową częstotliwością pracy w protezie serca, zastawki poddano oględzinom makro- i mikroskopowym. Na dysku zastawki z warstwą DLC zaobserwowano delikatne wytarcia w postaci bieżni spowodowane kontaktem z trójkątnymi „kolcami” pierścienia (RYS. 2b) - obserwowana bieżnia jest jednak mniejsza niż w przypadku dysku z niemodyfikowanego PEEKu (RYS. 2a).

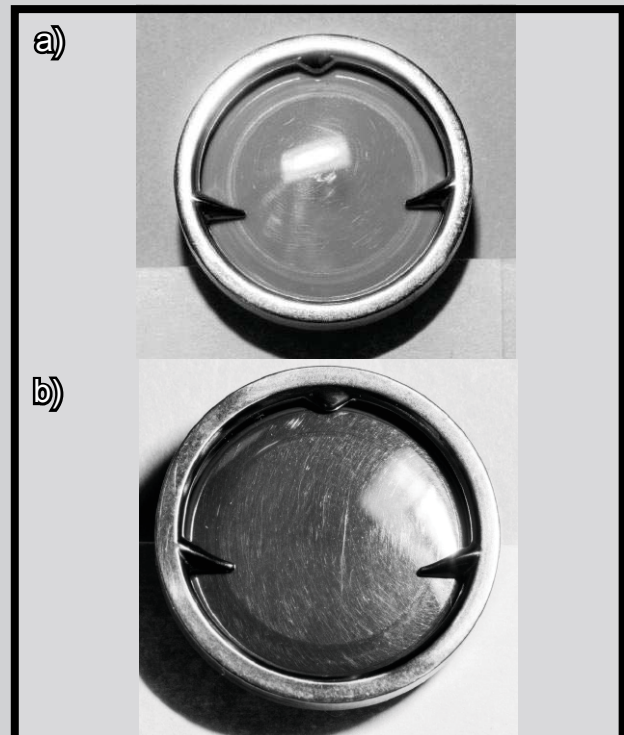
Results and Discussion

Micro hardness and fatigue tests of polymeric materials

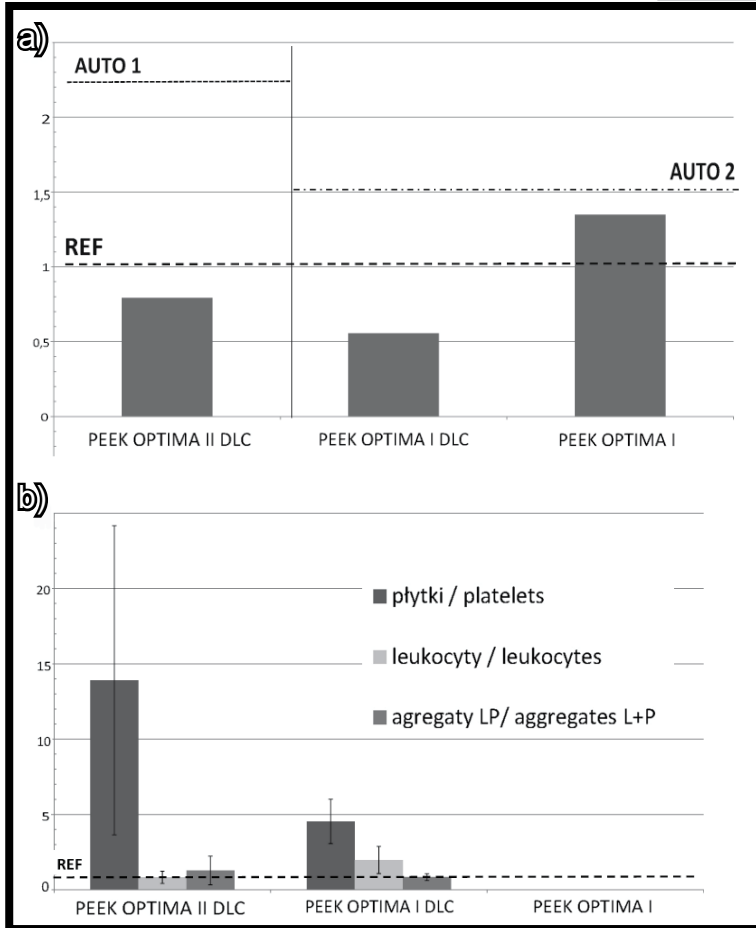
The micro hardness examinations of polymer samples revealed that unmodified PEEK hardness reached the level of $27 \text{ HV}_{0,01}$, and samples with a DLC layer hardness values were higher and reached the level of $35 \text{ HV}_{0,01}$. Due to the low number of the samples and the unknown nature of the random variable a nonparametric Wilcoxon test was applied. Statistic test result $p = 0.00655$ is less than the assumed statistical significance, and thus concentration degree of a random variable in the study groups are not equal.

Valve discs made of unmodified PEEK hardness reached the level of $27 \text{ HV}_{0,01}$, and samples with a DLC layer hardness values were higher and reached the level of $35 \text{ HV}_{0,01}$. Due to the low number of the samples and the unknown nature of the random variable a nonparametric Wilcoxon test was applied. Statistic test result $p = 0.00655$ is less than the assumed statistical significance, and thus concentration degree of a random variable in the study groups are not equal.

Unmodified PEEK and PEEK with a DLC layer underwent fatigue tests in a special laboratory stand. Discs with DLC layers were characterized by higher wear resistance than PEEK discs. After 120 days of fatigue tests - which correspond to two years of typical working conditions and with a typical work frequency in a heart assist device - the valves were inspected by macro- and microscopic observations. On the valve disc with DLC, gentle abrasions in the form of a treadmill were observed, caused by the contact with triangular valve housing „spikes” (FIG. 2b). However, the identified treadmill was relatively smaller than the treadmill obtained in valve discs made from unmodified polyetheretherketone (FIG. 2a).



RYS. 2. Zastawki mechaniczne typu Moll po przeprowadzeniu ponad 100 dniowego testu zmęczeniowego: a) dysk z niemodyfikowanego PEEKu, b) dysk z PEEKu pokrytego warstwą DLC. FIG. 2. Moll valves after 120 days fatigue test: a) PEEK disc, b) PEEK disc with DLC layer.



RYS. 3. Znormalizowane wyniki dla:
a) % aktywności badanych agregatów leukocytno-płytkowych we krwi po kontakcie z powierzchnią badanych polimerowych materiałów, n=6;

b) liczby zaadherowanych elementów komórkowych na powierzchni badanych materiałów po testach Impact-R, dla trzech serii badań: PEEK Optima I DLC - Polimer PEEK Optima z wytworzoną węglową warstwą typu DLC, próbki zostały wytworzone na wstępnie (częściowo) wypolerowanej formie wtryskowej; PEEK Optima II DLC - Polimer PEEK Optima z wytworzoną węglową warstwą typu DLC, próbki zostały wytworzone na dokładnie wypolerowanej formie wtryskowej. FIG. 3. Normalized results for:

a) % activation of platelet-leukocyte aggregates in the blood after contact with polymeric materials surface, n=6;

b) number of adhered cell elements on the polymeric materials surface after Impact-R tests, for three test series: PEEK Optima I DLC - PEEK Optima polymer with a carbon DLC layer, samples were produced utilizing a not precisely polished injection mold; PEEK Optima II DLC - PEEK Optima polymer with a carbon DLC layer, samples were produced utilizing a precisely polished injection mold.

Badania trombogenności materiałów polimerowych

Eksperyment został przeprowadzony na pełnowartościowej krwi w czasie zapewniającym prawidłowe funkcjonowanie płytek krwi. Wartości morfologiczne, parametry aktywacji układu płytkowego i leukocytnego krwi pobranej do badań były prawidłowe. We krwi nie stwierdzono obecności niesteroidowych leków przeciwzapalnych, co potwierdziło badanie agregacji płytek krwi w teście kwasu acetylosalicylowego ASPi na agregometrze impedancyjnym. Analiza statystyczna testem U Manna-Whitneya na poziomie istotności $p = 0,05$ wykazała, że dla aktywacji krwi wolnostojącej przed i po eksperymencie wartości były zbliżone, co oznacza, iż nie zdefiniowano znamiennej istotnych statystycznie różnic w autoaktywacji krwi.

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, iż obie badane powierzchnie polimerowe wykazały poziom aktywacji dla agregatów leukocytno-płytkowych poniżej poziomu autoaktywacji krwi (RYS. 3a). Jednak poziom aktywacji agregatów leukocytno-płytkowych dla PEEK był wyższy niż dla aktywacji krwi przez materiał referencyjny. W badaniach zaobserwowano, iż powłoki węglowe wytworzone na polimerze działają ochronnie, nie generując zwiększonej aktywacji krwi.

PEEK z warstwą węglową typu DLC cechował się adhezyjnością powyżej poziomu referencyjnego (RYS. 3b). Materiałem o najniższym potencjale trombogenicznym był niemodyfikowany polimer PEEK, dla którego nie zaobserwowano adhezji żadnych badanych elementów morfotycznych krwi.

W celu potwierdzenia dobrych własności atrombogenicznych badanych materiałów i w związku z tym możliwości ich zastosowania w elementach konstrukcyjnych protez zastawek serca, należy wykonać badania in vitro na krwi gotowych wyrobów medycznych, tj. prototypów protez zastawek serca wyposażonych w dyski wykonane z niemodyfikowanego PEEKu oraz PEEKu z warstwą DLC.

Thrombogenicity tests of polymeric materials

The examination was performed with a blood of standard value during the time ensuring proper platelets function. Morphology parameters, platelet and leukocytes systems activation properties of blood samples were correct. There was no non steroid anti-inflammatory drugs found in the blood, what was confirmed by blood platelets aggregation ASPi test utilizing an impedance aggregator. A statistical analysis with the utilization of a U Manna-Whitney test of a significance level of $p = 0.05$ revealed, that static sample blood activation values before and after the experiment were similar, which means, that there were no statistically significant differences in blood auto activation.

It was found that both polymer surfaces revealed the platelet-leukocyte aggregates activation level below the blood auto activation level (FIG. 3a). However, the platelet-leukocyte aggregates activation level of PEEK was higher than the blood activation level of reference material. It was observed that the carbon layer had a protective effect on the polymer surface without increasing the blood activation level.

PEEK with DLC layer was characterized by cell adhesion over the level of reference material (FIG. 3b). The material with the lowest thrombogenic potential was pure PEEK, for which no adhesion of blood components was observed.

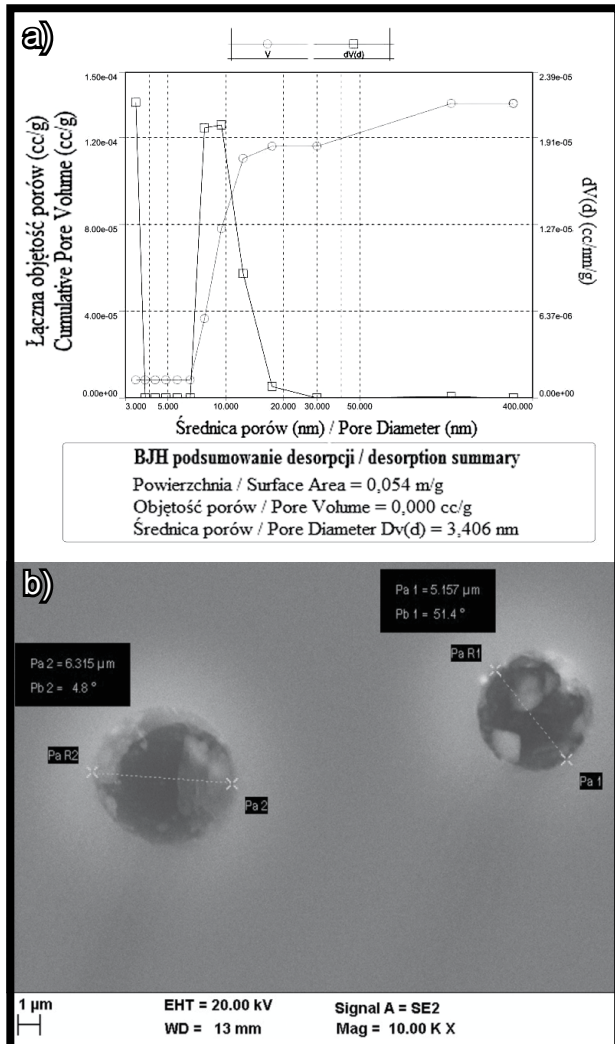
To confirm good thrombogenicity properties of tested biomaterials and its application possibilities in heart valves prostheses, additional in vitro blood tests should be performed of final medical devices, i.e. heart valves prototypes equipped with discs made from unmodified PEEK and PEEK with DLC layer.

Badania mikrotwardości i porowatości dla materiału węglowego

Wykonane badania potwierdziły, że opracowana metoda wytwarzania dysku z węgla szklistego pozwala na uzyskanie węglowego materiału mezoporowatego o czystości 99%, średnicy porów od 3 do 30 nm i wysokiej twardości rzędu 1434 HV_{0,01}. Zaobserwowano pojedyncze defekty w strukturze biomateriału w postaci porów wielkości około 6 μm (RYS. 4), których obecność mogła być wynikiem trudności technologicznych w fazie polimeryzacji alkoholu furfurylowego z katalizatorem. W ramach kontynuacji badań planowane jest wyeliminowanie niejednorodności poprzez prowadzenie procesu polimeryzacji w środowisku gazu obojętnego (argonu).

Badania trombogenności materiału węglowego

Poziom aktywacji receptorów leukocytno-płytkowych krwi po kontakcie z węglem szklistym był na porównywalnym poziomie jak poziom aktywacji receptorów po kontakcie z powierzchnią polistyrenową (RYS. 5a). Poziom adhezji agregatów leukocytno-płytkowych do powierzchni węgla szklistego był zbliżony do adhezji agregatów do materiału referencyjnego (RYS. 5b).



RYS. 4. a) krzywa BJH uzyskana dla próbki węgla szklistego; b) defekty w postaci pojedynczych porów.

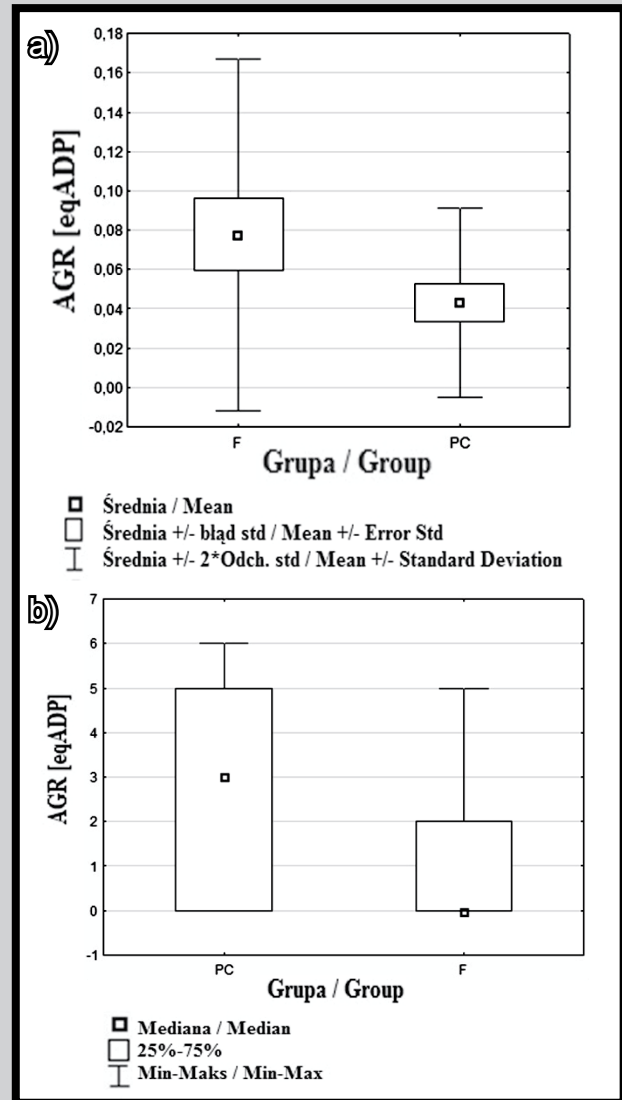
FIG. 4. a) BJH line obtained for glassy carbon sample; b) single pores defects.

Microhardness and porosity tests – carbon material

The investigations confirmed that the developed carbon material production process allow to obtain a mesoporus carbon material with 99% purity, pore diameter from 3.4 to 30 nm and high hardness about 1434 HV_{0,03}. Single defects in form of pores in size of approximately 6 μm were observed (FIG. 4), which could be the result of technical difficulties in the polymerization of furfural alcohol with the catalyst. It is planned to continue the research work on the carbon production method by carrying out the polymerization in an inert gas environment (argon).

Thrombogenicity tests – carbon material

The activation level of platelet-leukocytes receptors in the blood after contact with glassy carbon was on a comparable level to the activation of platelet-leukocytes in the blood after contact with polystyrene surface (FIG. 5a). The adhesion level of platelet-leukocytes aggregates for glassy carbon surface was similar to the results obtained for the reference material (FIG. 5b).



RYS. 5. Graficzne przedstawienie analizy statystycznej testem U Manna-Whitneya wyników: A - % aktywacji, B - adhezji agregatów leukocytno-płytkowych dla F (węgiel szklisty) próbek badanych i materiału referencyjnego PC (polistyren), n = 6. FIG. 5. Statistical analysis of U Mann-Whitney test results: A - % of activation, B - adhesion of platelet-leukocytes aggregates for F (glassy carbon) samples and reference material PC (polystyrene), n = 6.

Wyniki badań zmęczeniowych i ocena trombogenności materiałów polimerowych potwierdzają poprawne zastosowanie polimeru PEEK jako materiału na dysk zastawki mechanicznej przeznaczonej do stosowania krótkoterminowego (około 12 miesięcy) w pozaustrojowej pulsacyjnej pompie mechanicznego wspomaganie serca. Zastosowanie utwardzającej powłoki węglowej typu DLC na polimerze jest właściwym kierunkiem uzyskania bardziej wytrzymałej powierzchni dysku w kontakcie z tytanowym pierścieniem zastawki, co potwierdzają wyniki testów zmęczeniowych zastawek. Bazując na przeglądzie literaturowym słusznym jest także opracowywanie dysku wykonanego z materiału węglowego i odpornego na zużycie podczas długoterminowej pracy zastawki [4-8, 14, 15]. Przeprowadzone badania mikro-twardości biomateriałów potwierdziły wysoką twardość węgla szklanego, przeznaczonego do długoterminowego stosowania w zastawkach typu Moll. W dalszych etapach prac należy jednak przeprowadzić badania zmęczeniowe dysków węglowych w zastawce i odnieść wyniki do przeprowadzonych już badań zmęczeniowych zastawek z dyskami polimerowymi. Należy kontynuować badania nad uzyskaniem jednorodnej struktury węgla szklanego poprzez prowadzenie procesu polimeryzacji w środowisku gazu obojętnego (argonu).

Aby potwierdzić dobre własności atrombogeniczne badanych materiałów i w związku z tym możliwość ich zastosowania w elementach konstrukcyjnych protez zastawek serca, należy kontynuować badania w kierunku oceny in vitro na krwi gotowych wyrobów medycznych, tj. prototypów protez zastawek serca wyposażonych w dyski wykonane z niemodyfikowanego PEEKu, PEEKu z warstwą DLC i z węgla szklanego.

Podziękowania

Prace zrealizowano w ramach:

1. zadań badawczych strategicznego rządowego programu wieloletniego na lata 2007-2012 pn.: „Polskie Sztuczne Serce” (NCBiR);

2. projektu rozwojowego pt. „Opracowanie typoszeregu dyskowych zastawek mechanicznych dla pediatrycznych komór wspomaganie serca” (13-0118/10/2011, NCBiR);

3. projektu badawczego „Węglowy dysk dla zastawki mechanicznej dla polskich komór wspomaganie serca” (N N518 285540, NCN).

Piśmiennictwo

- [1] Religa G.: Współczesne zastosowanie mechanicznego wspomaganie serca. *Kardiologia i Torakochirurgia Polska* 3 (2007) 206-210.
- [2] Gonsior M.: Obróbki jarzeniowe stopu tytanu Ti6Al4V w aspekcie zastosowania na pierścieniu zastawki serca. Rozprawa doktorska.
- [3] Kapis A., Kustosz R., Bujok W., Jóźwik K., Obidowski D., Reorowicz P., Kłosiński P.: Blood pump in particular a pneumatic ventricular assist device; EP 2491966; Fundacja Rozwoju Kardiologii.
- [4] Rachwałik M., Biały D., Wawrzyńska M.: Mechaniczne protezy zastawek serca – historia i rozwój technologii. *Inżynieria Biomedyczna* 16, 3 (2010) 265-267.
- [5] Kobayashi, K.J., Williams, J.A., Nwakanma, L.U., Weiss: EuroSCORE predicts short- and mid-term mortality in combined aortic valve replacement and coronary artery bypass patients. *Journal of Cardiac Surgery* 24, 6 (2009) 637-643.
- [6] DeWall R.A., Qasim N., Carr L.: Evolution of mechanical heart valves. *The Annals of Thoracic Surgery* 69 (2000) 1612-1621.
- [7] Gott V.L., Alejo D.E., Cameron D.E. Mechanical heart valves: 50 years of evolution. *The Annals of Thoracic Surgery* 76(2003) 2230-2239.
- [8] Nair K., Muraleedharan C.V., Bhuvaneshwar G.S.: Developments in mechanical heart valve prosthesis. *SADHANA - Academy Proceedings in Engineering Sciences* 28 (2003) 575-587.

Conclusions

The obtained fatigue test and thrombogenicity assessment results of polymer materials indicate that the polymer PEEK can be applied for the valve discs dedicated to short-term application (up to 12 months) in an extracorporeal pulsatile ventricular assist device. The application of a hard DLC layer seems to be the right direction to obtain more durable disc surface in contact with the titanium housing which is confirmed by the valves fatigue tests results. Based on the literature review it is advisable to develop a carbon valve disc for long-term application [4-8,14,15]. The performed micro hardness material examinations confirmed the high hardness of glassy carbon, dedicated to long-term application in Moll valves. In the next step of research, fatigue tests of carbon discs should be performed and the obtained results should be referred to the fatigue test of the polymers discs results. The production method tests of a uniform glassy carbon material should be performed in the inert gas environment (argon).

To confirm good thrombogenicity properties of investigated biomaterials and its application possibilities in heart valves prostheses, complementary in vitro blood tests should be performed of final medical devices, i.e. heart valves prototypes equipped with discs made from unmodified PEEK, PEEK with a DLC layer and glassy carbon.

Acknowledgments

This research work was realized within the confines of:

1. “Polish Artificial Heart” multiannual government strategic program 2007-2012;

2. research project “Development of tilting mechanical valve series for paediatric ventricular assist devices” (13-0118/10/2011, NCBiR);

3. research project “Mechanical valve carbon disc for Polish ventricular assist devices” (N N518 285540, NCN).

References

- [9] Strona internetowa: <http://www.invivio.com/biocompatible-polymers/peek-optima.php>
- [10] Kaczorowski W., Niedzielski P., Mitura S.: Wytwarzanie warstw węglowych w nowym reaktorze MW/RF. *Inżynieria Biomateriałów* 43-44 (2005) 29-32.
- [11] Kościelniak-Ziemniak M., Wilczek P., Kustosz R., Gonsior M.: Biocompatibility in vitro investigation of ReligaHeart EXT ventricular assist device structural polymers, treated with technological process. *Engineering of Biomaterials* 15 (2012) 57-61.
- [12] Kościelniak-Ziemniak M., Gorka K., Kustosz R., Wilczek P., R. Wojnicz, Reichman-Warmusz E., Wiczorek J., Kosenyuk J., Smorąg Z.: Ocena biogodności polimeru dedykowanego konstrukcji pulsacyjnych protez wspomaganie serca. Referat na Międzynarodowej konferencji BioMedTech Silesia, Zabrze, Polska (2011).
- [13] Kustosz R., Kościelniak-Ziemniak M., Janiczak K., Gawlikowski M.: Badania protez serca powstających w programie Polskie Sztuczne Serce. *Biuletyn Programu Polskie Sztuczne Serce* 6 (2011) 9-24.
- [14] Kaczorowski W., Batory D., Niedzielski P., Kościelniak-Ziemniak M., Wilczek P., Gawlikowski M., Kustosz R., Szuber A., Gonsior M.: Plasma surface modification of disc artificial heart valves by carbon-based coatings. Referat na seminarium „Nowe trendy w toksykologii – nanocząstki i nanomateriały” Łódź (2012).
- [15] Kościelniak-Ziemniak M., Wilczek P., Gawlikowski M., Wierchoń T., Szuber A., Kustosz R., Gonsior M.: Badania trombogenności in vitro materiałów tytanowych modyfikowanych powierzchniowo dla zastosowania w konstrukcji pierścieni mechanicznych protez zastawek serca typu Moll. Poster na III konferencji Katowickiego Oddziału Polskiego Towarzystwa Diagnostyki Laboratoryjnej “Postępy medycyny laboratoryjnej” Ustroń, Polska (2012).