

odłamów kostnych, znajdujących się w warunkach elektrostymulacji metodą pojemnościową, pomiary grawitometryczne nie ujawniły zmiany ich masy. Obserwacje powierzchni wkrętów kostnych z warstwą węglową z wykorzystaniem mikroskopu elektronowego, skaningowego nie ujawniły żadnych uszkodzeń korozyjnych.

## Wnioski

Na podstawie przeprowadzonych można stwierdzić:

1. warunki elektrostymulacji zrostu kostnego u królików metodą półinwazyjną, z wykorzystaniem prądu impulsowego bez składowej stałej nie inicjują korozji implantów ze stali Cr-Mo-Ni z warstwami węglową. Nieliczne wytrawienia zlokalizowane na powierzchni pasywnej wkrętów kostnych, wykorzystywanych jako katody w półinwazyjnej metodzie elektrostymulacji, mają charakter lokalny i nie powodują mierzalnych z dokładnością  $5 \cdot 10^{-5}$  g zmian masy,
2. warunki elektrostymulacji zrostu kostnego u królików metodą pojemnościową z wykorzystaniem prądu prostokątnego, dwufazowego, symetrycznego o częstotliwości 60kHz i amplitudzie 2,0mA, modulowanego przebiegiem sinusoidalnym o częstotliwości 1Hz nie inicjują korozji implantów ze stali Cr-Mo-Ni z warstwą węglową,
3. uzyskane wyniki są zgodne z wynikami uzyskanymi w badaniach wpływu różnych metod i parametrów elektrostymulacji in vitro w płynie fizjologicznym Tyroda [7].

with the carbon layer (used in the capacitively coupled electrical field method) did not reveal significant mass changes. Observations of the bone screws coated with the passive-carbon layer carried out in the scanning electron microscope did not reveal any corrosion damage.

## Conclusions

On the basis of the results it can be concluded that:

1. electrostimulation of bone union in rabbits with the use of the semi-invasive method (the pulse current without constant component) does not initiate corrosion of the stainless steel implants coated with the passive and passive-carbon layer. Sparse etchings observed on the bone screw with the passive layer applied as the cathode in the semi-invasive method are local and do not cause the significant changes of mass.
2. electrostimulation of bone union in rabbits with the use of the capacitively coupled electrical field method (the rectangular, symmetric, biphasic current of the frequency equal to 60kHz and the amplitude equal to 2,0mA, modulated with the sinusoidal run of the frequency of 1Hz) does not initiate corrosion of the stainless steel implants coated with the carbon layer.
3. the obtained results are compatible with the results obtained from the tests carried out in the Tyrode physiological solution [7].

## Piśmiennictwo

- [1] PN-ISO 5832-1, 1997, Implants for surgery – Metallic materials – Wrought stainless steel.
- [2] Marciniak J., Research project of the Polish State Committee for Scientific Research (KBN) 4 1738 91 01, Silesian University of Technology, Gliwice 1991/94, (in Polish).
- [3] Z. Paszenda, J. Tyrlik-Held, Z. Nawrat, J. Zak, J. Wilczek, Usefulness of passive-carbon layer for implants applied in interventional cardiology, *Journal of Materials Processing Technology* 157-158C (2004) 399-404.
- [4] J. Szewczenko, Electric phenomena in long bone. *Electrotechnical Review*, 12, (2005), 94-97. (in Polish)

## References

- [5] L. Zichner, Repair of nonunions by electrically pulsed current stimulation, *Clinical Orthopaedics and Related Research* 161 (1981) 115-121.
- [6] A. Impagliazzo, A. Mattei, G. F. Spurio Pompili, S. Setti, R. Caddosi, Treatment of nonunited fractures with capacitively coupled electric field. *Journal of Orthopaedics and Traumatology* 7 (2006) 16-22.
- [7] J. Szewczenko, J. Marciniak, Corrosion of Cr-Ni-Mo steel implants electrically stimulated. *Journal of Materials Processing Technology* 175 (2006) 404-410.

## BADANIA ODDZIAŁYWANIA MATRYC ŻELATYNOWO- ALGINIANOWYCH NA SKŁADNIKI MORFOTYCZNE I BIAŁKA KRWI

MARIA SZYMONOWICZ<sup>1\*</sup>, STANISŁAW PIELKA<sup>1</sup>,  
DOROTA HAZNAR<sup>2</sup>, JANUSZ PLUTA<sup>2</sup>

<sup>1</sup> AKADEMIA MEDYCZNA,  
ZAKŁAD CHIRURGII EKSPERYMENTALNEJ I BADANIA BIOMATERIAŁÓW,  
UL. PONIATOWSKIEGO 2; 50-326 WROCLAW

<sup>2</sup> AKADEMIA MEDYCZNA,  
KATEDRA I ZAKŁAD TECHNOLOGII POSTACI LEKU,  
UL. SZEWSKA 38, 50-139 WROCLAW

\*E-MAIL: BIOCHEM@CHEKSP.AM.WROC.PL

## STUDIES OF REACTION OF GELATIN-ALGINATE MATRIXES ON MORPHOTIC ELEMENTS AND BLOOD PROTEINS

MARIA SZYMONOWICZ<sup>1\*</sup>, STANISŁAW PIELKA<sup>1</sup>,  
DOROTA HAZNAR<sup>2</sup>, JANUSZ PLUTA<sup>2</sup>

<sup>1</sup> MEDICAL UNIVERSITY, DEPARTMENT OF EXPERIMENTAL  
SURGERY AND BIOMATERIALS RESEARCH,  
2, PONIATOWSKIEGO STREET, 50-326 WROCLAW, POLAND

<sup>2</sup> MEDICAL UNIVERSITY,  
DEPARTMENT OF DRUG FORM TECHNOLOGY,  
38, SZEWSKA STREET, 50-139 WROCLAW

\*E-MAIL: BIOCHEM@CHEKSP.AM.WROC.PL

## Streszczenie

W pracy przedstawiono ocenę działania hemolitycznego i hemostatycznego matryc żelatynowo-alginianowych oraz matryc sieciowanych mleczanem wapnia po czasowym kontakcie z krwią w badaniach *in vitro*. Na podstawie uzyskanych wyników badań stwierdzono, że matryce nie wywołują istotnych zmian w wartościach odsetka hemolizy i stężenie hemoglobiny osoczkowej. Powodują aktywację układu krzepnięcia, skrócenie czasu rekalcynacji krwi i wydłużenie APTT. Wartości pomiarowe mieszczą się w zakresie wartości referencyjnych oznaczonych parametrów.

**Słowa kluczowe:** matryce żelatynowo-alginianowe, działanie hemolityczne, aktywacja układu krzepnięcia

[*Inżynieria Biomateriałów*, 69-72, (2007), 76-81]

## Wprowadzenie

Materiały polimerowe są stosowane w medycynie jako opatrunki oraz materiały hemostatyczne [1,2]. Zastosowanie polimerowych nośników leków w postaci implantów pozwala na uzyskanie przedłużonego w czasie uwalniania substancji leczniczej w ściśle określonym miejscu. Natomiast użycie do ich otrzymania polimerów biodegradowalnych oraz resorbowalnych umożliwia uzyskanie postaci leku nie wymagającej ponownej interwencji chirurgicznej. Od dawna są znane zalety miejscowego podawania substancji leczniczej w opatrunkach z polimerów bioresorbowalnych, takich jak żelatyna i alginiany. Stwierdzono, że żelatyna w preparatach do podania parenteralnego powodowała spowolnienie uwalniania leku [3]. Na bazie wyżej opisanych polimerów opracowano technologię wytwarzania porowej matrycy żelatynowo-alginianowej, jako nośnika dla substancji leczniczej, która tak jak zastosowane polimery powinna odznaczać się biologiczną obojętnością [4-7]. Badania w kontakcie z krwią matryc żelatynowo-alginianowych pozwolą na określeniu wzajemnych oddziaływań pomiędzy matrycą, a elementami morfotycznymi i białkami krwi.

Celem pracy była ocena wpływu matryc żelatynowo-alginianowych na elementy morfotyczne i białka krwi w warunkach *in vitro* w układzie statycznym.

## Material

Do badań użyto dwóch rodzajów matryc żelatynowo-alginianowych o strukturze gąbki przygotowanych w Katedrze Technologii Leku AM we Wrocławiu. Gąbki uzyskano poprzez spienienie mieszaniny jałowych roztworów żelatyny (20%), alginianu sodu (4%) w stosunku 8:2 i glicerolu w ilości 3% masy żelatyny. Dodatkowo jedną z serii poddano sieciowaniu za pomocą 4% roztworu mleczanu wapnia. Uzyskane spienione mieszaniny liofilizowano przez 24 h. Otrzymano suche jałowe matryce w postaci gąbek w kształcie walca o średnicy około 8,5mm i wysokości około 3cm o masie około 0,0250±0,006g.

## Metody

### Badania cech farmaceutycznych

Dla wytworzonych, gąbek wykonano badania cech farmaceutycznych: oznaczenie średniej gęstości teoretycznej zdolności sorpcyjnych [4-7].

## Abstract

The paper presents an evaluation of hemolytic and hemostatic activity of gelatin-alginate matrixes and cross-linking of the matrix with calcium ions after contact with human blood in *in vitro* studies. In view of the results it has been reported that a matrix does not cause important quantitative changes in the percentage of hemolysis and free hemoglobin concentration. In the plasma coagulation system evaluation blood recalcification time was shortened and activated partial thromboplastin time (APTT) was prolonged. That suggested that coagulation processes were activated.

**Keywords:** gelatin-alginate matrixes, hemolytic action, coagulation system activation

[*Engineering of Biomaterials*, 69-72, (2007), 76-81]

## Introduction

Polymeric materials are used in medicine as dressings and hemostatic materials [1,2]. Use of polymeric carriers of drugs in the form of implants will allow to obtain release of therapeutic substance in precisely defined place prolonged in time. On the other hand the achievement of the form of drug not requiring a new surgical intervention is enabled by their use to obtain biodegradable polymers. The values of local application of therapeutic substance in dressings from bioresorbable polymers such as gelatin, alginates have been known for a long time. It was observed that gelatin in preparations for parenteral application caused slowness of drug release [3]. On the basis of the above described polymers the technology of production of porous gelatin-alginate matrix as a carrier for therapeutic substance was worked out which should show, similarly as the used polymers, biological neutrality [4-7]. Studies of gelatin-alginate matrixes in contact with blood will allow to determine mutual reactions between the matrix and the morphotic elements and blood proteins.

The purpose of the work was evaluation of the influence of gelatin-alginate matrixes on the morphotic elements and blood proteins in conditions *in vitro* in the static system.

## Material

Two kinds of gelatin-alginate matrixes with the sponge structure prepared in Department of Drug Form Technology in Wrocław Medical University were used. Sponges were obtained through foaming of a mixture of sterile solutions of gelatin (20%), sodium alginate (4%) in relation 8:2 and glycerol in quantity of 3% gelatin mass. Additionally, one of the series was cross-linked with the help of 4% solution of calcium lactate. The obtained mixtures were lyophilized over 24 hours. Dry sterile matrixes in the form of sponges, shape of a cylinder, with diameter about 8.5mm and height about 3cm, with mass about 0.0250±0.006g were obtained.

## Methods

### Pharmaceutic features studies

Determination of mean theoretical density [4-7] and sorption ability were performed for the obtained sponges.

## Badania krwi

Badania w kontakcie z krwią wykonano w Zakładzie Chirurgii Eksperymentalnej i badania biomateriałów AM we Wrocławiu. Doświadczenia przeprowadzono na krwi ludzkiej pobranej na cytrynian sodu (1:10, V:V) oraz na osoczu ubogopłytkowym. Proporcje materiału do krwi dobrano doświadczalnie [8–15].

### Badanie działania hemolitycznego

#### Oznaczenie odsetka hemolizy

Roztwór chlorku sodu z gąbką ( $0,020 \pm 0,006 \text{ g/5ml}$ ) oraz bez materiału inkubowano przez 24 h w temp.  $37^\circ\text{C}$ . Następnie dodano zgęszczonych erytrocytów ( $20 \mu\text{l}$ ) i wstawiono do temp.  $37^\circ\text{C}$  na okres 4 h. Z oznaczenia absorbancji w próbce badanej i kontroli obliczono odsetek hemolizy [10,12].

#### Oznaczenie hemoglobiny pozakrwinkowej

Krew cytrynianową z gąbką żelatynową ( $0,0108 \pm 0,004 \text{ g/2ml}$ ) oraz bez materiału (kontrola) inkubowano przez 24 h w temp.  $37^\circ\text{C}$ . Następnie krew wirowano i w osoczu oznaczono stężenie hemoglobiny pozakrwinkowej, osoczkową, metodą Drabkina [10,12-14].

#### Ocena morfologiczna składników krwi

Ocenie poddano barwione rozmazy z krwi kontrolnej i po kontakcie z gąbkami w których określono morfologię erytrocytów, granulocytów, monocytów, limfocytów jak i krwinek płytkowych. Rozmazy barwiono metodą Maya, Grunwalda and Giemsy i oceniono pod imersją w mikroskopie [10,12-14].

### Badania działania hemostatycznego

#### Oznaczenie czasu krzepnięcia (rekalcynacji) pełnej krwi

Ludzką krew cytrynianową inkubowano z próbką materiału ( $0,0025 \pm 0,007 \text{ g/0,5ml}$ ) przez 15, 30, 60 i 120 min. w temp.  $37^\circ\text{C}$ . Następnie dodano równą objętość r-ru chlorku wapniowego i mierzono czas krzepnięcia krwi. Pomiar zakończono w momencie pojawienia się pierwszych nitek fibryny. Równolegle wykonano pomiary dla krwi kontrolnej, bez materiału [10,12,15].

#### Oznaczenie czasu krzepnięcia osocza cytrynianowego

Osocze cytrynianowe wraz z próbką materiału ( $0,0072 \pm 0,005 \text{ g/1,4ml}$ ) oraz bez materiału (kontrola) inkubowano przez 15, 30, 60, 120 min w temp.  $37^\circ\text{C}$ . W osoczu oznaczono czas częściowej trombolastyny po aktywacji (PTT), aktywność czynnika XII, czas protrombinowy (PT), czas trombinowy (TT) i stężenie fibrynogenu (Fb). Pomiary wykonano na koagulometrze Coag Crom 3003, firmy Bio-Ksel [12,16,17,18,19].

### Analiza statystyczna

Wyniki badań poddano analizie statystycznej. Obliczono wartości średnie i odchylenie standardowe. Istotne różnice w średnich wartościach określono testem T dla prób zależnych. Przyjęto, że współczynniki korelacji są istotne przy  $*p < 0,05$ ,  $**p < 0,01$ ,  $***p < 0,001$ .

### Wyniki

Średnia gęstość teoretyczna gąbek żelatynowo-alginianowych była dwukrotnie mniejsza niż gąbek modyfikowanych mleczanem wapnia ( $0,262 \pm 0,032 \text{ g/cm}^3$ ). Charakteryzo-

## Blood studies

Studies in contact with blood were performed in Department of Experimental Surgery and Biomaterials of Wrocław Medical University. The experiments were performed on human blood taken for sodium citrate (1:10, V:V) and on average-platelet-rich plasma. The proportions of the material to blood were chosen experimentally [8–15].

### Hemolytic studies

#### Determination of hemolysis percentage

Solution of sodium chloride with sponge ( $0,020 \pm 0,006 \text{ g/5ml}$ ) and without material was incubated over 24 hours at temperature  $37^\circ\text{C}$ . Next, condensed erythrocytes ( $20 \mu\text{l}$ ) were added and put into temperature  $37^\circ\text{C}$  for the period of 24 hours. The percentage of hemolysis was calculated from the determination of absorbance in the tested sample and control [10,12].

#### Determination of extracellular hemoglobin

Citrate blood with gelatin sponge ( $0,0108 \pm 0,008 \text{ g/2ml}$ ) and without material /control/ was incubated over 24 hours at temperature  $37^\circ\text{C}$ . Next, the blood was centrifuged and the concentration of extracellular, plasmatic hemoglobin was determined in plasma with cyanomethemoglobin method [10,12-14].

#### Morphological evaluation of blood elements

Stained smears of blood were evaluated; morphology of erythrocytes, granulocytes, monocytes, lymphocytes as well as thrombocytes were determined. Smears of control blood and after contact with sponges were stained with Maya, Grunwalda and Giemsa methods. The smears were observed in immersive magnification a light microscope [10,12-14].

### Hemostatic action studies

#### Determination of recalcification time

Human citrate blood was incubated with material sample ( $0,0025 \pm 0,007 \text{ g/0,5ml}$ ) over 15, 30, 60 and 120 minutes. at temperature  $37^\circ\text{C}$ . Next, an equal volume of calcium chloride was added and recalcification time of blood was measured. The measurement was finished with appearance of first threads of fibrin. Simultaneously, measurement was made for control blood, without material [10, 12, 15].

#### Determination of coagulation time of citrate plasma

Citrate plasma with material sample ( $0,0072 \pm 0,005 \text{ g/1,4ml}$ ) and without material (control) was incubated over 15, 30, 60 and 120 min. at temp.  $37^\circ\text{C}$ . In the plasma were assessed: activated partial thromboplastin time (APTT), factor XII activity (FXII), prothrombin time (PT), thrombin time (TT) and fibrinogen concentration (Fb). The measurements were performed at  $+37^\circ\text{C}$  using coagulometer Coag. Crom 3003 by Bio-Ksel, Poland [12,16,17,18,19].

### Statistic analysis

The results were subjected to statistical analysis. Arithmetical mean and standard deviation were counted. Important differences in mean values were estimated by the test T for dependent samples. It was assumed that correlation coefficients were essential at:  $*p < 0,05$ ,  $**p < 0,01$ ,  $***p < 0,001$ .

### Results

Mean theoretical density of gelatin-alginate sponges was twice lower than sponges modified with calcium lactate

Matryca Matrix	Gęstość teoretyczna Theoretical density [g/cm <sup>3</sup> ]	Zdolności sorpcyjne Sorption capacity (1g water of absorbed by 1 g of matrix)
Żel/Alg/Mlecz Ca	0,262 ± 0,032	3,461±0,481
Żel/Alg	0,142 ± 0,007	4,740 ± 0,444

**TABELA 1. Właściwości farmaceutyczne matrycy żelatynowo-alginiowej (Żel/Alg) i modyfikowanych mleczanem wapnia (Żel/Alg/Mlecz Ca)**  
**TABLE 1. Pharmaceutic properties of gelatin-alginate matrixes (Żel/Alg) and modified calcium lactate (Żel/Alg/Mlecz Ca).**

wały się też lepszymi zdolnościami sorpcyjnymi, pochłaniały one bowiem blisko 5g wody na 1g gąbki podczas gdy matryce sieciowane pochłaniały około 3,5 gram wody na 1gram gąbki (TAB.1). W badaniach działania hemolitycznego z użyciem zagęszczonych krwinek czerwonych nie stwierdzono istotnych różnic w wartościach odsetka hemolizy (TAB.2).

Średnia wartość odsetka hemolizy, bez względu na rodzaj użytego materiału, nie przekroczyła dopuszczalnej wartości (3%). Stężenie Hb w osoczu dla gąbek nie modyfikowanych była zbliżona do wartości kontrolnej (27,44±1,23), a dla modyfikowanych wartość była zwiększona. Stwierdzone wartości stężenia hemoglobiny osoczowej nie przekro-

Matryca Matrix	Skrócenie CT w porównaniu do kontroli Shortened CT in comparison with control				Wydłużenie APTT w porównaniu do kontroli Prolonged APTT in comparison with control			
	15 min	30 min	60 min	120 min	15 min	30 min	60 min	120 min
Żel/Alg/Mlecz Ca	42	39	43	49	75	70	45	47
Żel/Alg	56	53	56	55	13	20	18	19

**TABELA 3. Wartości czasu rekalcynacji krwi (CT) i czasu częściowej trombotoplastyny po aktywacji osocza po kontakcie z gąbkami żelatynowo-alginiowymi (Żel/Alg) i modyfikowanych mleczanem wapnia (Żel/Alg/Mlecz Ca) w funkcji czasu.**  
**TABLE 3. Recalcification shortened percentage (CT) and activated partial thromboplastin time prolonged percentage after contact with gelatin-alginate matrixes (Żel/Alg) and modified calcium lactate (Żel/Alg/Mlecz Ca) in time function.**

Matryca Matrix	Czas Time [min]	APTT [s]	FXII Aktywność / Activiy [%]	PT [s]	TT [s]	Fb [g/l]
Żel/Alg/Mlecz Ca	15	56,03±4,62 ***	7,66±1,53***	13,25±0,15*	11,76±0,10**	4,61±0,03
	30	54,43±4,62 ***	5,33±1,54***	13,52±0,21**	11,53±0,05**	4,62±0,03
	60	46,63±1,10 ***	5,66±2,01***	13,38±0,14***	11,78±0,16**	4,56±0,08
	120	47,02±1,53 ***	5,53±1,89***	13,24±0,21***	11,86±0,10**	4,56±0,07
Kontrola	15	31,92± 0,29	100,00±2,51	12,90±0,14	11,10±0,20	4,65±0,02
	30	32,02± 0,30	99,00±2,64	12,82±0,24	11,08±0,13	4,63±0,09
	60	32,13±0,26	95,00±2,47	12,73±0,19	11,16±0,10	4,70±0,04
	120	32,22±0,34	98,00±2,78	12,60±0,16	11,86±0,10	4,67±0,05
Żel/Alg	15	37,16±0,47**	6,27±1,33***	12,60±0,20	10,96±0,31	4,51±0,05
	30	40,37±0,16***	4,78±2,22***	12,47±0,15	11,40±0,26	4,36±0,08
	60	42,07±0,35***	4,53±1,85***	13,20±0,13	10,70±0,26	4,39±0,03
	120	42,50±0,11***	4,49±1,90***	13,40±0,10	10,60±0,22	4,37±0,04
Kontrola	15	33,27±0,74	100,00±2,51	12,47±0,16	10,83±0,15	4,48±0,07
	30	33,76±0,65	99,00±2,64	12,17±0,15	11,03±0,15	4,30±0,05
	60	35,50±0,20	95,00±2,47	12,46±0,15	10,07±0,31	4,33±0,06
	120	35,56±0,25	98,00±2,78	12,56±0,15	10,03±0,25	4,49±0,08

\*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001 różnica istotna w porównaniu do kontroli  
 \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001 differences of statistic importance in relation to the control

**TABELA 4. Wartości czasu częściowej trombotoplastyny po aktywacji (APTT), czasu protrombinowego (PT) czasu trombinowego (TT) i stężenie fibrynogenu (Fb) w osoczu kontrolnym i po kontakcie z matrycami żelatynowo-alginiowymi (Żel/Alg) i modyfikowanych mleczanem wapnia (Żel/Alg/Mlecz Ca) w funkcji czasu**  
**TABLE 4. Activated partial thromboplastin time (APTT), factor XII activity, prothrombin time (PT), thrombin time (TT) and fibrinogen concentration (Fb) in the control plasma and after contact with the gelatin-alginate matrixes (Żel/Alg) and modified calcium lactate (Żel/Alg/Mlecz Ca) in time function.**

Matryca Matrix	H [%]	Hb [g/ml]
Żel/Alg/Mlecz Ca	0,88 ± 0,10	38,47 ± 1,83
Żel/Alg	0,99 ± 0,11	31,03 ± 3,14

**TABELA 2. Wartości odsetka hemolizy (%H) i stężenie hemoglobiny (Hb) w osoczu po kontakcie z matrycami żelatynowo-alginiowymi (Żel/Alg) i modyfikowanych mleczanem wapnia (Żel/Alg/Mlecz Ca)**  
**TABLE 2. Hemolysis percentage and extracellular hemoglobin concentration in plasma after contact with (the) gelatin-alginate matrixes (Żel/Alg) and modified calcium lactate (Żel/Alg/Mlecz Ca)**

(0.262±0.032g/cm<sup>3</sup>). They were also characterized with better sorption abilities because they absorbed almost 5g of water for 1g of sponge while cross-linking matrixes absorbed about 3.5 grams of water for 1 gram of sponge (TAB.1). Essential differences in the values of hemolysis percentage were not observed in studies of hemolytic action with use of condensed erythrocytes (TAB.2). The mean value of hemolysis percentage, no matter what kind of material was used, did not exceed the permissible value (3%). Concentration of Hb in plasma for non-modified sponges was similar to the control value (27.44 ±1.23) and the value for modified ones was increased. The observed values of plasmatic hemoglobin concentration did not exceed 40 mg/dl of the correct value (TAB.2). No essential changes were observed in the morphological pic-

ture of erythrocytes. The mean value of hemolysis percentage, no matter what kind of material was used, did not exceed the permissible value (3%). Concentration of Hb in plasma for non-modified sponges was similar to the control value (27.44 ±1.23) and the value for modified ones was increased. The observed values of plasmatic hemoglobin concentration did not exceed 40 mg/dl of the correct value (TAB.2). No essential changes were observed in the morphological pic-

czyły 40 mg/dl wartości prawidłowej (TAB.2). Po kontakcie krwi z gąbkami nie stwierdzono istotnych zmian w obrazie morfologicznym składników krwi. Krwinki czerwone miały postać echinocyta. Krwinki białe były prawidłowego kształtu nie obserwowano zmian w obrazie jądra komórkowego. Krwinki płytkowe były ułożone luźno oraz w zlepkach po kilka i kilkanaście komórek. W osoczu po kontakcie z gąbkami stwierdzono istotne wydłużenie APTT ( $p < 0,001$ ) w porównaniu do grupy kontrolnej. Dla gąbek modyfikowanych wartości APTT były przedłużone w porównaniu do niemodyfikowanych. Aktywność czynnika XII była zmniejszona istotnie ( $p < 0,001$ ) od wartości kontrolnej. Dla gąbek modyfikowanych wartości PT i TT były również istotnie wydłużone ( $p < 0,01$ ), natomiast stężenie fibrynogenu we wszystkich czasach pomiaru było na porównywalnym poziomie i nie różniło się od wartości kontrolnej. Oceniane gąbki istotnie ( $p < 0,001$ ) skracają czas krzepnięcia krwi cytrynianowej po uwapnieniu (TAB.3,4). Czas rekalcynacji dla gąbek modyfikowanych jest zmniejszony w porównaniu do niemodyfikowanych (TAB.3).

## Omówienie

Matryce żelatynowo-alginianowe oraz modyfikowane mleczanem wapnia poddano czasowemu kontaktowi z krwią celem określenia wzajemnych oddziaływań pomiędzy materiałem a elementami morfotycznymi oraz białkami krwi. Matryce w kontakcie z krwią ulegały przejściu w żel. Matryce modyfikowane jonami wapnia posiadały zagęszczoną strukturę prawdopodobnie w wyniku usieciowania kwasu alginowego, a co za tym idzie zmniejsza możliwość wiązania wody w porach matrycy. Zmniejszenie zdolności sorpcyjnych jest także wynikiem powstawania alginianu wapnia, który w wodzie jest nierozpuszczalny i nie ulega pęcznieniu w takim stopniu jak sól sodowa [7]. Różnice w oznaczanych wartościach parametrów farmaceutycznych mogą mieć istotny wpływ podczas kontaktu z tkankami. Działanie hemolityczne matryc określone poprzez pomiar stopnia hemolizy erytrocytów, stężenia hemoglobiny osoczowej i oceny morfologicznej elementów krwi. Badania wykonano na pełnej krwi cytrynianowej. Średnia wartość odsetka hemolizy, bez względu na rodzaj użytego materiału, nie przekroczyła dopuszczalnej wartości 3%. Stężenie Hb w osoczu było poniżej wartości 40 mg/dl, będącą górną wartością zakresu normy [12]. Działania hemostatyczne matryc oceniono w oparciu o pomiar czasów krzepnięcia krwi i osocza cytrynianowego. Aktywację układu krzepnięcia, zależnego od czynników kontaktu (układ wewnątrzpochodny), oceniono testem APTT oraz poprzez oznaczenie aktywności czynnika XII. Aktywację układu krzepnięcia, zależną od tromboplastyny tkankowej (układ zewnątrzpochodny), oceniono testem PT. Pomiarem łączącym obydwa układy był test TT- czas trombinowy, który wyznacza konwersję fibrynogenu w fibrynę i zależy od ilości fibrynogenu. Analiza zmian w wartościach parametrów krzepnięcia posłużyła do określenia stopnia aktywacji osoczowego układu krzepnięcia przez badane matryce. Gąbki żelatynowo-alginianowe skracają czas krzepnięcia krwi cytrynianowej po uwapnieniu oraz wydłużają APTT i zmniejszają aktywność czynnika XII. Matryca żelatynowo-alginianowa modyfikowana mleczanem wapnia szybciej aktywuje krzepnięcie krwi (skrótowe CT), oraz znacząco wpływa na wartość APPT. Czas kontaktu tych gąbek z osoczem miał wpływ na oznaczenie. Po 15 i 30 minutach kontaktu stwierdzone wydłużenie, które było zwiększone w porównaniu do wartości po 60 i 120 minutach. Różnice te mogą być związane z przejściem postaci gąbki w żel, powodując lepszy kontakt z białkami osocza jak również ze składnikami odczynnika APTT (glinka krze-

ture of blood elements after contact with sponges. Erythrocytes had the form of echinocyte. Leukocytes had the correct shape and no changes were observed in the picture of cell nucleus. Thrombocytes were set loosely in clumps containing several or more than ten cells.

Essential prolongation APTT ( $p < 0,001$ ) was observed in plasma after contact with sponges in comparison with control. For modified sponges the values APTT were prolonged in comparison with non-modified ones. Activity of factor XII was essentially decreased ( $p < 0,001$ ) than the control value. For modified sponges values PT and TT were also essentially prolonged ( $p < 0,01$ ), however fibrinogen concentration in all measurement times was on a comparable level and was not different from control. The evaluated sponges essentially ( $p < 0,001$ ) shorten coagulation time of citrate blood after calcification (TAB.3,4). Recalcification time for modified sponges is decreased in comparison with non-modified ones (TAB.3).

## Discussion

In the studies of density and sorption ability gelatin-alginate sponges show that an addition of substance for flexibility (glycerol) and cross-linking factor (calcium lactate) influences the change of physicochemical parameters of matrix. Matrixes modified with calcium ions possessed condensed structure (stiffened) obtained, probably, as the result of cross-linking of alginate acid which decreases water binding in matrix pores. The decrease of sorption abilities is also the result of appearance of calcium alginate which is not soluble in water and does not swell as much as sodium salt [7] Differences in the determined values of pharmaceutical parameters may have an essential influence in contact with tissues. Gelatin-alginate matrixes and those modified with calcium lactate were subjected to temporal contact with blood in order to determine mutual reactions between the material and morphotic elements and proteins of blood. The matrixes in contact with blood changed into gel. The hemolytic action of matrixes was determined through measurement of the degree of hemolysis of erythrocytes, plasmatic hemoglobin and morphological evaluation of blood elements. The studies were performed on full citrate blood. The mean value of hemolysis percentage, no matter what kind of material was used, did not exceed the permissible value 3%. Concentration of Hb in plasma was below value 40 mg/dl which is the upper value of standard range [12]. The hemostatic action of matrixes was evaluated on the basis of measurement of recalcification time of blood and citrate plasma. The activation of coagulation system, dependent on the contact factors (endogenous system), was evaluated with test APTT and through determination of the activity of factor XII. The activation of coagulation system, dependent on tissue thromboplastin (exogenous system), was evaluated with test PT. Test TT – thrombin time which determines conversion of fibrinogen into fibrin and depends on the amount of fibrinogen is the measurement connecting both systems. The analysis of changes in the values of coagulation parameters was used to determine the level of activation of plasmatic coagulation system by the studied matrixes. Gelatin-alginate sponges shorten coagulation time of citrate blood after calcification and prolongate APTT and decrease the activity of factor XII. Gelatin-alginate matrix modified with calcium lactate more quickly activates blood coagulation (shortened CT) and significantly influences the value of APTT. The contact time of those sponges with plasma influenced the determination. After 15 and 30 minutes of contact, prolongation was observed which was increased in comparison with the value after 60 and 120 minutes. Those

mionkowa i chlorek wapnia). Zmiana postaci gąbki (żel) najprawdopodobniej spowodowała zmniejszenie czynnika XII jest związane z jego inaktywacją, wywołaną kontaktem ze składnikami gąbki żelatynowo-alginianowej. Wydłużają one również na wartości PT i TT bez wpływu na zmianę stężenia fibrynogenu. Stwierdzone zmiany w osoczym układzie krzepnięcia dla ocenianych matryc nie przekraczają zakresu wartości referencyjnych oznaczonych wskaźników (PT:10,6-13,2-15,8s), (TT: 10,3-12,5-15,5), (Fb:0,3-6,0g/l). Natomiast stwierdzone wartości APTT dla gąbek modyfikowanych nieznacznie przekraczała zakres normy (29,2-36,5-43,8s).

Na podstawie przeprowadzonych badań i uzyskanych wyników można stwierdzić, że oceniane matryce żelatynowo-alginianowych przyspieszają proces krzepnięcia krwi. Matryca modyfikowana w większym stopniu powoduje aktywację w wewnątrz- i zewnątrzpochoydnym układzie krzepnięcia (przedłużony APTT i PT) bez wpływu na zmianę stężenia fibrynogenu. Stwierdzone zmiany wartości parametrów nie przekraczają istotnie zakresu wartości referencyjnych dla tych wskaźników, ma to znaczenie diagnostyczne.

## Wnioski

1. Matryce żelatynowo-alginianowe nie wywołują działania hemolitycznego.
2. Matryce żelatynowo-alginianowe aktywują układ krzepnięcia.
3. Matryce żelatynowo-alginianowe modyfikowane mleczanem wapnia w większym stopniu oddziałują na elementy morfotyczne i białka krwi.

## Podziękowania

*Praca wykonana w ramach projektu badawczego nr 1260 Akademii Medycznej we Wrocławiu*

differences can be connected with transformation of the sponge form into gel causing a better contact with plasma proteins as well as with the elements of factor APTT (silicon bole and calcium chloride). The change of the sponge form (gel) most probably caused decrease of factor XII and is connected with its inactivation caused by contact with the elements of gelatin-alginate sponge. They also prolongate on values PT and TT without influence on the change of fibrinogen concentration. The observed changes in plasmatic coagulation system for the evaluated matrixes do not exceed the range of referential values of the determined indexes (PT:10.6-13.2-15.8s), (TT:10.3-12.5-15.5), (Fb 0.3-6.0g/l). But the observed values APTT for modified sponges slightly exceeded the range of standard (29.2-36.5-43.8s).

On the basis of the carried out studies and obtained results it can be assumed that the evaluated gelatin-alginate matrixes quicken the process of blood coagulation. Modified matrix causes activation in endo- and exogenous coagulation system (prolonged APTT and PT) in a larger extent without influence on the change of fibrinogen concentration. He observed changes of parameters values do not exceed essentially the range of referential values for those indexes, it has a diagnostic significance.

## Conclusions

1. Gelatin-alginate matrixes do not cause hemolytic action.
2. Gelatin-alginate matrixes activate coagulation system.
3. Gelatin-alginate matrixes modified with calcium lactate react on morphotic elements and blood proteins in a larger extent.

## Acknowledgements

*The work was supported by the project No. 1260 of the Wrocław Medical University.*

## Piśmiennictwo

- [1] Grzybowski J.: Lecznice zastosowanie polskich biomateriałów kolagenowych, Polim Med 27, 3-4, (1997); 11-18.
- [2] Young Seon Choi i wsp.: Study on gelatin-containing artificial skin: I. preparation and characteristics of novel gelatin-alginate sponge, Biomaterials 20, (1999), 409-417.
- [3] Martson M. i wsp.: Is cellulose sponge degradable or stable as implantation material? An in vivo subcutaneous study in the rat, Biomaterials 20, (1999), 1989-1995.
- [4] Pluta J., Haznar D.: Resorbable polymeric sponges as drug carriers. Part 1. Gelatin sponges, Polym Med 31, 1-2, (2001), 18-26.
- [5] Pluta J., Haznar D.: Resorbable polymeric sponges as drug carriers. Part 2. Gelatin sponges, Polym Med 31, 3-4, (2001), 16-24.
- [6] Pluta J., Haznar D.: The effect of composition upon the physical and chemical properties of biodegradable gelatin polymer matrixes, Polym Med 32, 3-4, (2002), 11-19.
- [7] Pluta J., Haznar D.: Properties and active substance release kinetics from gelatin-alginate matrices. Polym Med 36, 3, (2006), 16-24.
- [8] PN-EN ISO 10993-12:2002: Biologiczna ocena wyrobów medycznych. Część 12 : Przygotowanie próbek i materiałów odniesienia.
- [9] PN-EN ISO 10993-1:2001: Biologiczna ocena wyrobów medycznych – Ocena i badania.
- [10] PN-EN 30993-4:2002: Biologiczna ocena wyrobów medycznych – część4 Wybór badań interakcji z krwią.
- [11] Szymonowicz M., Łowkis B: In vitro testing method of polymers candidate destined for contact with blood. Polym Med 20, 1-4,(1990), 43- 54.
- [12] Szymonowicz M., Pielka S., Owczarek A, Haznar D., Pluta D.: Study on influence of gelatin-alginate matrixes on the coagulation system and morphotic blood elements, Macromolecular Symposia 253, (2007), 71-76.

## References

- [13] Pielka S, Szymonowicz M, Paluch D, Librant Z, Karaś J, Karmelita-Buczyńska H, Jegerman Z: Estimation of the reaction of the state of corundum ceramics surface roughness on the chosen blood parameters, Eng Biomater 6, (2003), 59-62.
- [14] Pielka S, Szymonowicz M, Paluch D, Karaś J, Librant Z, Karmelita-Buczyńska H, Jegerman Z: Investigation of sulphur composites reaction on the coagulation system and cellular elements of blood, Eng Biomater 6, (2003), 63-66.
- [15] Szymonowicz M, Paluch D., Solski L, Bałasińska A., Krucińska I., Szosland L.: Evaluation of the influence of dibutylchitin materials for activation of blood coagulation system, Eng Biomater 38-43, (2004), 123-126.
- [16] Instrukcja obsługi koagulometr Coag Chrom 3003 (CC-3003). Bio-Ksel, Grudziądz 2005, 1- 17.
- [17] Szymonowicz M., Kratochwil J., Rutowski R., Staniszevska-Kuś J., Paluch D., Solski L., Żywicka B.: Evaluation of the influence of topical haemostatics materials on coagulation and fibrinolysis parameters. Eng Biomater 7-8 (1999), 45-52.
- [18] Paluch D., Szymonowicz M., Pielka S., Majda J.: Wpływ materiałów o różnym stopniu zwilżalności na wybrane parametry układu krzepnięcia” Polim Med 31, 1-2, (2001), 27-32.
- [19] Paluch D., Szymonowicz M. Pielka S., Rutowski R.: In vitro studies of the influence polyester materials with a different degree of surface wettability have on blood haematological parameters and coagulation and fibrinolysis system parameters. Polym Med 32, 1-22, (2001), 41- 64