

OCENA WPŁYWU STANU CHROPOWATOŚCI POWIERZCHNI CERAMIKI KORUNDOWEJ NA WYBRANE PARAMETRY KRWI

STANISŁAW PIELKA*, MARIA SZYMONOWICZ*, DANUTA PALUCH*,
ZDZISŁAW LIBRANT**, JOANNA KARAS***, HENRYKA KARMELITA -
BUCZYŃSKA****, ZBIGNIEW JEGERMAN***

*ZAKŁAD CHIRURGII EKSPERYMENTALNEJ I BADANIA BIOMATERIAŁÓW
AKADEMII MEDYCZNEJ WE WROCŁAWIU

**INSTYTUT TECHNOLOGII MATERIAŁÓW ELEKTRONICZNYCH W
WARSZAWIE,

*** INSTYTUT SZKŁA I CERAMIKI W WARSZAWIE

**** LABORATORIUM ANALITYCZNE AKADEMICKIEGO SZPITALA
KLINICZNEGO WE WROCŁAWIU

Wstęp

Pozytywne doświadczenia z zastosowaniem wyrobów z ceramiki korundowej do protezowania dróg żółciowych, zachęcają do podjęcia prób zastosowania tego materiału do protezowania naczyń krwionośnych lub tworzenia urządzeń mających bezpośredni kontakt z krwią. Korzystną cechą tego biomateriału jest możliwość wykorzystania go jako nośnika antybiotyków, o przedłużonym czasie uwalnianiu leku [1]. Klasyczna proteza naczyń krwionośnych, dziana lub tkana, może ulec zakażeniu, zwłaszcza w środowisku gorszego ukrwienia tkanek i wymagać wymiany, albo może być konieczne protezowanie naczyń krwionośnych w środowisku pierwotnie niejadalnym [2]. W środowisku zakażonym drobnoustrojami, protezowanie naczyń krwionośnych materiałem z właściwościami bakteriobójczymi, byłoby szczególnie pożądane.

Dotychczasowe doświadczenia kliniczne z zastosowaniem protez naczyniowych impregnowanych antybiotykami lub solami srebra, są zachęcające [3, 4, 5, 6]. Niejednokrotnie dzięki takim protezom możliwe jest uratowanie kończyny lub życia chorego. Wadą tego rodzaju protez jest zbyt szybkie uwalnianie antybiotyku z protezy dakronowej lub poliestrowej i toksyczne oddziaływanie soli srebra na elementy morfotyczne krwi, i na tkanki otaczające wszczep [6, 7]. Zbudowanie protezy naczyniowej z materiału nie zaburzającego układu krzepnięcia i nie uszkadzającego elementów morfotycznych krwi, którą można by przywrócić przepływ krwi, chociaż na krótki okres, i która jednocześnie mogłaby być nośnikiem substancji bakteriobójczych, stanowiłoby istotny postęp w chirurgii naczyniowej [8, 9, 10]. Celem pracy była ocena wpływu ceramiki korundowej o różnym stopniu chropowatości powierzchni na hemolizę, proces krzepnięcia i elementy morfotyczne krwi w warunkach in vitro, w układzie statycznym.

Materiał

W Instytucie Technologii Materiałów Elektronicznych w Warszawie wytworzono monolityczną ceramikę korundową, z której otrzymano próbki w postaci płytek i kostek sześciennych o różnym stanie chropowatości:

ESTIMATION OF THE REACTION OF THE STATE OF CORUNDUM CERAMICS SURFACE ROUGHNESS ON THE CHOSEN BLOOD PARAMETERS

STANISŁAW PIELKA*, MARIA SZYMONOWICZ*, DANUTA PALUCH*,
ZDZISŁAW LIBRANT**, JOANNA KARAS***, HENRYKA KARMELITA -
BUCZYŃSKA****, ZBIGNIEW JEGERMAN***

*DEPARTMENT OF EXPERIMENTAL SURGERY AND BIOMATERIAL
RESEARCH, WROCLAW MEDICAL
UNIVERSITY

**INSTITUTE OF ELECTRONICAL MATERIALS TECHNOLOGY IN
WARSAW

***INSTITUTE OF GLASS AND CERAMICS IN WARSAW

****ANALYTICAL LABORATORY ASK IN WROCLAW

Introduction

Positive experiences in applying products from corundum ceramics encourage to take attempts of applying this material in prosthesing blood vessels or in producing devices having direct contact with blood. An advantage of this biomaterial is the possibility of its application as an antibiotic carrier with a prolonged time of medicament release [1]. The classical blood vessels prosthesis - knit or woven - can become infected, particularly in an environment of worse blood supply of tissues and it can require an exchange or prosthesing in blood vessels in an originally non-sterile environment can be necessary [2]. In an environment infected with microorganisms, prosthesing of a blood vessel with material having bacteriocidal properties would be particularly wanted.

The clinical experiences in application of vascular prostheses impregnated with antibiotics or silver salts we have made hitherto are encouraging [3, 4, 5, 6]. It is possible to save the patient's limb or life many times thanks to such prostheses. The disadvantage of this kind of prostheses is too quick releasing of antibiotics from a dacron or polyester prosthesis and toxic reaction of silver salt on morphotic elements of blood and on the tissues surrounding the implant [6, 7]. Production of a vascular prosthesis from material not

disturbing the clotting system and not damaging the morphotic elements of blood and which could restore the blood flow, for at least a short period, and which at the same time could be a carrier of bacteriocidal substances, would constitute an essential progress in vascular surgery [8, 9, 10]. The purpose of the study was the estimation of the influence of corundum ceramics with various degrees of surface roughness on hemolysis, clotting process and the morphotic elements of blood in vitro conditions in the static system].

Material

In the Institute of Electronical Materials Technology in Warsaw monolithic corundum ceramics was produced, from

1. ceramikę zwartą, bez porowatości otwartej, o chropowatości powierzchni $R_a = 0,8 - 1,2 \mu\text{m}$,
2. ceramikę z powierzchnią szlifowaną, z chropowatością powierzchni $R_a = 0,3 - 0,4 \mu\text{m}$,
3. ceramikę z powierzchnią polerowaną, o chropowatości $R_a = < 0,16 \mu\text{m}$.

Stan powierzchni ceramiki przyjęto jako parametr funkcjonalny dla kontaktu z krwią. Wszystkie próbki przeznaczone do badań były poddane sterylizacji radiacyjnej.

Rodzaj materiału Kind of material	Czas Time [h]	Hb [mg/dl]
Tworzywo korundowe Corundum material	4	31,41 ± 3,09
	24	37,26 ± 3,36
Tworzywo korundowe szlifowane Ground corundum material	4	32,68 ± 3,44
	24	39,99 ± 5,32
Tworzywo korundowe polerowane Polished corundum material	4	33,26 ± 1,41
	24	37,99 ± 2,93
Kontrola Control	4	27,02 ± 3,61
	24	35,55 ± 1,01

Metody i wyniki

Badania w kontakcie z krwią wykonano w Zakładzie Chirurgii Eksperymentalnej i Badania Biomateriałów Akademii Medycznej we Wrocławiu.

Do badań użyto krwi O Rh+, pobranej na płyn konserwujący CPD (citrate-phosphate-dextrose). Zmiany we krwi po inkubacji w temperaturze 37°C z próbkami ceramiki korundowej oraz we krwi kontrolnej określano po 4 godz. i po 24 godz. [11, 12, 13, 14] Stężenie hemoglobiny pozakrwinkowej w osoczu oznaczono metodą cyjanomethemglobinową [15,16]. Oceny morfologicznej komórek krwi dokonano w rozmazach barwionych metodą MMG, w powiększeniu immersyjnym mikroskopu świetlnego [15, 17].

Stężenie wolnej hemoglobiny w osoczu, otrzymanym z krwi po 4 i 24 godzinnym kontakcie z badanymi materiałami, było w zakresie wartości stwierdzonych dla krwi kontrolnej (TAB. 1). W barwionych rozmazach krwi nie stwierdzono zmian morfologicznych krwinek czerwonych, białych (granulocyty, monocyty, limfocyty) i krwinek płytkowych. Próbkę ceramiki korundowej o różnym stopniu chropowatości, po czasowym kontakcie z krwią, nie uległy deformacji lub innym zmianom. Krew z powierzchni próbek łatwo zmywała się.

Wpływ ceramiki korundowej na krzepnięcie krwi określono poprzez oznaczenie czasu rekalcynacji [15]. Oznaczenie wykonano dla krwi po inkubacji z materiałem przez 2 i 4 godz. w temp 37°C. Czas krzepnięcia krwi po uwapnieniu, stwierdzony dla ocenianych próbek z ceramiki korundowej porównano z czasem krzepnięcia w probówkach polistyrenowych (PS) jak i do czasu krzepnięcia w szkle.

Dla ceramiki korundowej zwartej oraz korundowej szlifowanej stwierdzono skrócenie czasu krzepnięcia średnio o 44% w porównaniu do czasu w kontroli PS. Wartości czasu krzepnięcia dla tych materiałów były porównywalne.

Czas krzepnięcia stwierdzony dla tworzywa korundowego polerowanego był wydłużony o 23% w porównaniu do zwartej korundu szlifowanego, ale skrócony średnio o 29% w stosunku do kontroli PS (TAB. 2).

Obserwację procesu formowania skrzepu oraz pomiar czasu rekalcynacji wykonano na próbkach w postaci płytek. Na powierzchnię płytek наносono pełną krew cytrynianową i obserwowano jej kształt. Następnie dodano równą objętość chlorku wapniowego i mierzono czas krzepnięcia. Pomiar zakończono w momencie pojawienia się

which samples in the shape of plates and cubes with various roughness degrees were obtained.

1. dense ceramics without open porosity with surface roughness $R_a = 0,8-1,2 \mu\text{m}$,
2. ceramics with ground surface, with surface roughness $R_a = 0,3-0,4 \mu\text{m}$
3. ceramics with polished surface, with roughness $R_a = < 0,16 \mu\text{m}$.

The state of the ceramics surface was accepted as a functional parameter for contact with blood. All the samples designed for tests underwent radiation sterilization.

TABELA 1. Stężenie hemoglobiny pozakrwinkowej w osoczu kontrolnym i po kontakcie z ceramiką korundową.

TABLE 1. Extracellular hemoglobin concentration in control plasma and after contact with corundum ceramics.

Methods and results

The tests were made in contact with blood in Department of Experimental Surgery and Biomaterial Investigation of Academy of Medicine in Wrocław.

Blood O Rh+ taken for preserving liquid CPD (citrate-phosphate-dextrose) was used in the tests. The changes in blood after incubation in temperature 37°C with samples from corundum ceramics and in control blood were determined after 4 and 24 hours [11, 12, 13, 14]. Extracellular concentration of hemoglobin in plasma was determined with cyjanomethemglobin method [15,16]. Morphological estimation of blood cells was made in smears stained with MMG method in immersive magnification in a light microscope [15, 17].

Hemoglobin concentration in plasma obtained from blood after 4 and 24 hour contact with the tested materials was within values determined for the control blood (TAB. 1). In the stained smears there were no morphological changes of red, white blood cells (granulocytes, monocytes, lymphocytes) and platelets.

The samples of corundum ceramics with various roughness degrees did not undergo deformation or other changes after a temporal contact with blood. Blood from the samples' surfaces was removed easily.

The influence of corundum ceramics on blood clotting was determined by stating calcium clotting time. Determining was made for blood after incubation with the material for 2 and 4 hours in temp. 37°C. The blood clotting time after calcification determined for the tested samples from corundum ceramics was compared with the clotting time in polystyrene (PS) test-tubes and with the clotting time in glass. For dense and ground corundum ceramics, shortening of the clotting time was stated by 44% on an average in comparison with the time in control PS. The clotting time values for these materials were comparable. The clotting time determined for polished corundum ceramics was prolonged by 23% on an average in comparison with dense corundum and after grinding but it was shortened in relation to the control PS (TAB. 2).

Observation of the process of clot formation and measurement of calcium clotting time was made on the samples in the form of plates. Whole citrated blood was put on the plates surface and its shape was observed. Next an equal

Rodzaj materiału Kind of material	Czas kontaktu Contact time [min]	Czas krzepnięcia Clotting time [s]	Skrócenie czasu krzepnięcia w stosunku do kontroli Shortening of clotting time in relation to control		Wydłużenie czasu krzepnięcia w stosunku do kontroli Prolongation of clotting time in relation to control	
			szkło % glass %	PS % PS %	szkło % glass %	PS % PS %
			Ceramika korundowa Corundum ceramics	120 240	144 ± 4,54 158 ± 12,75	3 --
Ceramika korundowa szlifowana Ground corundum ceramics	120 240	14,8 ± 1,89 166 ± 0,85	-- --	6 40	-- 12	-- --
Ceramika korundowa polerowana Polished corundum ceramics	120 240	198 ± 6,94 191 ± 10,08	-- --	7 30	33 28	-- --
PS Kontrola / PS Control Szkło / Glass	-- --	273 ± 18,50 148 ± 16,45	-- --	-- 46	84 --	-- --

TABELA 2. Czas krzepnięcia krwi cytrynianowej po kontakcie z ceramiką korundową mierzony w probówce.
TABLE 2. Clotting time of citrate blood after contact with corundum ceramics measured in a test-tube.

pierwszej nitki łączącej haczyk bagietki z badaną mieszaniną.

Na powierzchni szklanej kropla krwi była rozplaszczona, a tworzenie się skrzepu wystąpiło szybciej w porównaniu do powierzchni PS.

Na powierzchni ceramiki korundowej, chropowatej, kropla krwi miała kształt elipsy. Czas krzepnięcia był skrócony o 16% w porównaniu do szkła, a o 58% do powierzchni PS.

W stosunku do korundu szlifowanego skrócenie czasu wynosiło 27%, a do korundu polerowanego - 39%.

Na powierzchni ceramiki korundowej szlifowanej kropla krwi była rozplaszczona i miała kształt elipsy. Czas krzepnięcia był wydłużony w porównaniu do szkła o 15%, a do ceramiki korundowej o 36%, natomiast w stosunku do PS był skrócony o 43%, a do korundu polerowanego o 2%.

Na powierzchni ceramiki korundowej polerowanej kropla krwi szybko i równomiernie się rozplaszczala i miała kształt kulisty. Czas krzepnięcia był skrócony o 42% w porównaniu do PS, a wydłużony o 17% w stosunku do szkła i 39% do ceramiki korundowej (TAB. 3).

Podsumowując wyniki badań można stwierdzić, że ceramika korundowa nie wywołuje działania hemolitycznego, natomiast skraca czas krzepnięcia krwi. Czasowy kontakt krwi z ceramiką korundową, o różnej chropowatości powierzchni nie spowodował zwiększenia stężenia hemoglobiny pozakrwinkowej w osoczu oraz zmian w obrazie morfologicznym krwinek czerwonych, białych i płytkowych. Ocenił ceramiki korundowe przyspieszają proces krzepnięcia krwi. Skrócenie czasu krzepnięcia stwierdzono zarówno dla próbek w postaci sześcianów jak i płytek.

volume of calcium chloride was added and the clotting time was measured. The measurement was finished at the moment of appearing of a thread connecting the hook of the glass rod with the tested mixture.

On the surface of rough corundum ceramics the blood drop was ellipse - shaped. The clotting time was shortened by 16 in comparison with the glass and by 58% in comparison with the PS surface. In comparison with ground corundum ceramics the shortening of time was by 27% and with polished corundum - by 39%.

On the surface of ground corundum ceramics the blood drop was flattened and ellipse - shaped. The clotting time was prolonged in comparison with glass by 15% and with corundum ceramics by 36%, but in relation to PS it was shortened by 43% and to polished corundum by 2%.

On the surface of polished corundum ceramics the blood drop flattened quickly and regularly and was ball-shaped. The clotting time was shortened by 42% in comparison with PS and prolonged by 17% in relation to glass and by 39% - to corundum ceramics (TAB. 3).

Summarizing the investigation results we can state that corundum ceramics does not cause hemolytic action, however it shortens the blood clotting time.

Temporal contact of blood with corundum ceramics with differentiated surface roughness did not cause increase in extracellular hemoglobin concentration in plasma nor changes in the morphological picture of red, white blood cells and platelets. The estimated corundum ceramics precipitate the blood clotting process. Shortening of the clotting time was observed both for cube-shaped and plate-shaped samples.

Rodzaj materiału Kind of material	Czas kontaktu Contact time [s]	Czas krzepnięcia Clotting time [s]	Skrócenie czasu krzepnięcia w stosunku do kontroli Shortening of clotting time in relation to control		Wydłużenie czasu krzepnięcia w stosunku do kontroli Prolongation of clotting time in relation to control	
			szkło % glass %	PS % PS %	szkło % glass %	PS % PS %
			Ceramika korundowa Corundum ceramics	120	156 ± 18,76	16
Ceramika korundowa szlifowana ground corundum ceramics	120	213 ± 16,74	--	43	5	--
Ceramika korundowa polerowana 2,0x2,0x2,0 Polished corundum ceramics	120	217 ± 15,88	---	42	17	--
PS Kontrola / PS Control Szkło / Glass	120 120	403 ± 62,57 184 ± 11,21	-- --	-- 148	119 --	-- --

TABELA 3. Czas krzepnięcia krwi cytrynianowej na powierzchni tworzywa korundowego.
TABLE 3. Clotting time of citrate blood on the corundum material surface.

1. Ceramika korundowa, korundowa szlifowana i korundowa polerowana, nie wykazują działania toksycznego na składniki morfotyczne krwi.
2. Ceramika korundowa, korundowa szlifowana i korundowa polerowana, aktywują proces krzepnięcia krwi.
3. Ceramika korundowa polerowana wywołuje najmniejsze zmiany badanych parametrów krwi.

Podziękowanie

Praca finansowana przez grant KBN Nr 7 T08D 016 18.

Piśmiennictwo

- [1] Lewandowski R., Grzybowski J., Karaś J., Jaegermann Z., Poleśński Z.: Kinetyka uwalniania antybiotyków z implantów ceramicznych. W druku: Polim. w Med.
- [2] Gutowski P., Birkenefeld B., Cnotliwy M.: Ocena przydatności badania znakowanymi Tc99m-HM-PAO leukocytami w diagnostyce zakażenia protezy naczyniowej. Polski Przeg. Chir. 1997, 6, 620-624.
- [3] Pupka A., Skóra J., Janczak D., Ruciński A., Korta K., Barć P., Stępiński P., Szyber P.: Leczenie masywnego zakażenia w chirurgii naczyniowej przy użyciu protezy dakronowej, uszczelnionej kolagenem i impregnowanej solami srebra. Polim. Med. 2003, 1-2, 41-45.
- [4] Goeau-Brissoniere O. A., Fabre D., Leflon-Guibout V.: Comparison of the resistance to infection of rifampin-bonded gelatin-sealed and silver/collagen-coated polyester prosthese. J. Vasc. Surg., 2002, 35, 1260-1263.
- [5] Darouiche R. O.: Anti-infective efficacy of silver-coated medical prostheses. Clin. Infect. Naukowe PWN Warszawa 1998
- [6] Schierholz J. M., Lucas L. J., Rump A., Pulverer G.: Efficacy of silver-coated medical devices. J. Hosp. Infect. 1998, 40, 257-262.
- [7] Kinney E. V., Bandyk D. F., Seabrook G. A. et al.: Antibiotic-bonded PTFE vascular grafts: the effect of silver antibiotic on bioactivity following implantation. J. Surg. Res. 1991, 50, 430-435.
- [8] Paluch D., Szymonowicz M., Pielka S., Majda J.: Wpływ materiałów o różnym stopniu zwilżalności na wybrane parametry układu krzepnięcia" Polim. w Med., 31, 1-2, 2001, 27-32.

Conclusions

1. Corundum, corundum ground and corundum polished ceramics do not show toxic action on the morphotic elements of blood.
2. Corundum, corundum ground and corundum polished ceramics activate the blood clotting process.
3. Corundum ground ceramics causes the smallest changes of tested blood parameters.

Acknowledgement

This study was supported by the Grant KBN No 7 T08D 016 18.

References

- [9] Paluch D., Szymonowicz M., Pielka S., Rutowski R.: Badania in vitro wpływu materiałów poliestrowych o różnym stopniu zwilżalności powierzchni na parametry hematologiczne krwi oraz na parametry układu krzepnięcia i fibrylizy. Polim. w Med. 32, 1-2, 41-64.
- [10] Paluch D., Szymonowicz M., Rutowski R., Milewski A., Pielka S., Solski L., Raczyński K.: Badania śródoperacyjne i badania zmian wybranych parametrów krzepnięcia i fibrylizy, po implantacji protez poliestrowych DALLON H o zwiększonej zwilżalności powierzchni. Polim. w Med. 32, 1-2, 65-79.
- [11] PN-EN ISO 10993-12:2002 Biologiczna ocena wyrobów medycznych. Część 12: Przygotowanie próbek i materiałów odniesienia.
- [12] PN-EN ISO 10993-1:2001 Biologiczna ocena wyrobów medycznych - Ocena i badania. [13], PN-EN ISO 30993-4:2002 Biologiczna ocena wyrobów medycznych - część 4 Wybór badań interakcji z krwią.
- [14] Szymonowicz M., Łowkis B.: In vitro testing method of polymers candidate destined for contact with blood. Polimery w Medycynie 1990, 20, 1-4, 43-54.
- [15] Bomski H.: Podstawowe badania hematologiczne. WL PZWL Warszawa 1995.
- [16] Dąbrowski Z.: Fizjologia krwi. Wybrane zagadnienia cz. 1. 2. Wydawnictwo Naukowe PWN Warszawa 1998
- [17] Krzemińska - Ławkowiczowa I Maj S.: Atlas hematologii klinicznej. WL PZWL Warszawa 1993.