

# BADANIA ODDZIAŁY- WANIA KOMPOZYTÓW SIARKOWYCH NA UKŁAD KRZEPNIĘCIA I ELEMENTY KOMÓRKOWE KRWI

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

\*ZAKŁAD CHIRURGII EKSPERYMENTALNEJ I BADANIA BIOMATERIA-  
LÓW AKADEMII MEDYCZNEJ WE WROCŁAWIU,

\*\* INSTYTUT TECHNOLOGII MATERIAŁÓW ELEKTRONICZNYCH W  
WARSZAWIE,

\*\*\* INSTYTUT SZKŁA I CERAMIKI W WARSZAWIE,

\*\*\*\* LABORATORIUM ANALITYCZNE AKADEMICKIEGO SZPITALA  
KLINICZNEGO WE WROCŁAWIU

Tworzywa siarkowe typu spoiw są kompozytami, w któ-  
rych siarka stanowi matrycę, a rozdrobniona część (cera-  
mika, piasek kwarcowy) stanowi fazę rozproszoną. Twor-  
zywa te stosowane są między innymi do łączenia części  
metalowych z ceramicznymi. Odpowiednio modyfikowane  
tworzywo siarkowe, zastosowane jako warstwa ochronna  
na wszczepach, może poprawić biogodność wszczepów  
wobec tkanek. Charakterystyczną cechą tych tworzyw jest  
ich hydrofobowość, co jest korzystne w przypadku materia-  
łów mających kontakt z krwią [1, 2, 3, 4, 5, 6].

Celem badań było określenie wpływu tworzyw siarko-  
wych na pełną krew. Badania wykonano w Zakładzie Chi-  
rurgii Eksperymentalnej i Badania Biomateriałów Akademii  
Medycznej we Wrocławiu. Badania dotyczyły:

1. oddziaływania hemolitycznego tworzyw siarkowych przez  
oznaczenie stężenia hemoglobiny pozakrwinkowej po kon-  
tacie z próbkami,
2. wpływu wyżej wymienionych tworzyw na elementy mor-  
fotyczne krwi i,
3. na czas krzepnięcia krwi.

## Material

Próbki do badań, przygotowane w Instytucie Technologii  
Materiałów Elektronicznych, stanowiły płytki i kostki sze-  
ściennie, o następującym składzie:

1. tworzywo siarkowe SK o zawartości: S - 82,5%, SiO<sub>2</sub> -  
2,5%, CaCO<sub>3</sub> - 15%,
2. tworzywo siarkowe SW o zawartości: S - 94%, SiO<sub>2</sub> -  
3%, C - 3,0%.

Próbki do badań biologicznych poddano sterylizacji radia-  
cyjnej.

## Metody i wyniki

Do badań użyto krwi O Rh+, pobranej na płyn konser-  
wujący CPD. Tworzywa siarkowe inkubowano z krwią w  
temperaturze 37°C. Zmiany we krwi oraz wygląd makrosko-  
powy badanych próbek oceniono po 2 godz. i po 24 godz.  
[7, 8, 9, 10].

Stężenie hemoglobiny pozakrwinkowej w osoczu krwi  
oznaczono metodą cyjanomethemoglobinową [11, 12]. Oce-

# INVESTIGATION OF SULPHUR COMPOSITES REACTION ON THE COAGULATION SYSTEM AND CELLULAR ELEMENTS OF BLOOD

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

\*THE DEPARTMENT OF EXPERIMENTAL SURGERY AND BIOMATE-  
RIALS RESEARCH OF WROCLAW MEDICAL UNIVERSITY,

\*\*INSTITUTE OF ELECTRONICAL MATERIALS TECHNOLOGY IN  
WARSAW,

\*\*\*INSTITUTE OF GLASS AND CERAMICS IN WARSAW,

\*\*\*\*ANALYTICAL LABORATORY ASK IN WROCLAW

Sulphur materials of binder - type are composites in which  
sulphur constitutes the matrix and the broken-up part (ce-  
ramics, quartz sand) constitute the scattered phase. These  
materials are used, among others, for connecting metallic  
with ceramic parts. Properly modified sulphur material used  
as a protective layer on implants can improve implant  
biocompatibility with the tissue. The characteristic feature of  
these materials is its hydrophoby and it is beneficial in the  
case of materials having contact with blood [1, 2, 3, 4, 5, 6].

The aim of the investigations was the influence of sul-  
phur materials on whole blood. The investigations were  
made in The Department of Experimental Surgery and  
Biomaterials Research of Wrocław Medical University. The  
investigations dealt with:

1. haemolytic reaction of sulphur materials by determina-  
tion of extracellular haemoglobin concentration after con-  
tact with the samples,
2. influence of the above mentioned materials on the mor-  
photic blood elements and,
3. on the blood coagulation time.

## Material

The samples for the tests prepared in Institute of  
Electronical Materials Technology were made up of plates  
and cubes with the following structure:

1. Sulphur material SK with the contents: S - 82,5%, SiO<sub>2</sub> -  
2,5%, CaCO<sub>3</sub> - 15%,
2. Sulphur material SW with the contents: S - 94%, SiO<sub>2</sub> -  
3%, C - 3,0%

The samples underwent radiation sterilization for biological  
investigations.

## Methods and results

Blood ORh+ taken for preservative CPD was used in the  
investigations. The sulphur materials were incubated in  
blood at temperature 37°C. The changes in blood and mi-  
croscopic appearances of the tested samples were esti-  
mated after 2 and 24 hours [7, 8, 9, 10].

Extracellular haemoglobin concentration was determined  
with the cyanomethemoglobin method [11, 12]. Morpho-  
logical estimation of morphotic blood elements was made



Rodzaj materiału Kind of material	Czas Time [h]	Hb [mg/dl]
Tworzywo siarkowe SK Sulphur material SK	4 24	40,91±1,92 69,30±6,22
Tworzywo siarkowe SW Sulphur material SW	4 24	49,67±3,47 55,85±1,55
Kontrola Control	4 24	27,02± 3,61 35,55± 1,01

**TABELA 1. Stężenie hemoglobiny pozakrwinkowej w osoczu kontrolnym i po kontakcie z tworzywem siarkowym**

**TABLE 1. Extracellular haemoglobin concentration in control plasma and after contact with sulphur material**

ny morfologicznej składników morfotycznych krwi dokonano w barwionych preparatach krwi metodą MGG w powiększeniu imersyjnym mikroskopu świetlnego [11, 13].

Stężenie hemoglobiny pozakrwinkowej w osoczu otrzymanym po kontakcie z tworzywem siarkowym SK oraz SW było zwiększone w porównaniu do wartości we krwi kontrolnej. Stwierdzone wartości hemoglobiny dla tworzywa SW były zmniejszone w porównaniu do tworzywa SK (TAB. 1). W obrazie mikroskopowym krwi cytrynianowej stwierdzono prawidłowy kształt krwinek czerwonych i białych oraz płytek krwi. Natomiast po 24 godz. obserwowano krwinki czerwone typu akantocyta. W barwionych rozmazach krwi po kontakcie z tworzywem siarkowym SK stwierdzono krwinki czerwone typu akantocyta oraz rulonizację krwinek. Zmiany w kształcie krwinek były bardziej widoczne po 24 godz. kontaktu z tworzywem. W obrazie białokrwińkowym oraz krwinek płytkowych nie obserwowano zmian. We krwi po kontakcie z tworzywem siarkowym SW stwierdzono akantocyty i rulonizację krwinek czerwonych. Wydłużenie czasu kontaktu materiału z krwią wywołało większe zmiany w kształcie krwinek czerwonych i białych.

Próbki z tworzywa siarkowego SK po czasowym kontakcie z krwią różniły się swoim wyglądem od próbek siarkowych SW. Wokół próbek SK stwierdzono utworzony skrzep czerwono-krwinkowy. Wielkość i przyczepność skrzepu do ścianek próbek była związana z gładkością, powierzchni materiału oraz zależna od czasu kontaktu z krwią.

Wpływ tworzyw siarkowych na krzepnięcie krwi określono poprzez oznaczenie czasu rekalcynacji [11]. Oznaczenie wykonano dla krwi po kontakcie z materiałem przez 2

in stained preparations with MGG method in immersive magnification in a light microscope [11, 13].

Extracellular haemoglobin concentration in plasma obtained after contact with sulphur material SK and SW was increased in comparison with the value in control blood. The observed haemoglobin values for material SW were decreased in comparison with material SK (TAB. 1). In the macroscopic picture of citrate blood the correct shape of red and white cells and platelets was observed. However, after 24 hours red cells of acanthocyte-type were observed. In the stained blood smears after contact with sulphur material SK red cells of acanthocyte-type and rouleau formation of blood cells were observed. The changes in the cells shape were not visible after 24 hour contact with the material. In the picture of white cells and platelets changes were not observed. In blood after contact with sulphur material SW acanthocytes and rouleau formation of red cells were observed. Prolongation of the contact time of the material with blood caused larger changes in the shape of red and white cells.

The samples from sulphur material SK after a temporal contact with blood were different in appearance from the sulphur samples SW. A red-cellular clot formation was observed around the samples SK. The size and clot adhesiveness to the sample walls were linked with the material surface smoothness and depended on the contact time with blood.

The influence of sulphur materials on blood coagulation was established by determining the calcium coagulation time. The determination was made for blood after contact with the material after 2 and 4 hours in temp. 37 C. The coagulation time after calcification observed for sulphur materials was compared with the coagulation time on the PS and glass surface.

Shortening of the coagulation time by mean 44% for sulphur material SK was observed in comparison with the control PS and with sulphur material SW. The coagulation time was similar to the value observed on the glass surface. The coagulation time for sulphur material SW was prolonged with relation to the sulphur material SK and comparable with the value observed for the PS surface (TABLE 2).

Observation of the clot formation and measurement of the coagulation time was made on the samples in the shape of plates. Whole blood was inserted on the samples surface and its shape was observed. Next, calcium coagulation time was measured.

On the surface of smooth polished sulphur material SK the blood drop was ball-shaped. Blood coagulation was

Rodzaj materiału Kind of material	Czas kontaktu Contact time [min.]	Czas krzepnięcia Coagulation time [s]	Skrócenie czasu krzepnięcia w stosunku do kontroli Shortening of coagulation time in relation to control		Wydłużenie czasu krzepnięcia w stosunku do kontroli Prolongation of coagulation time in relation to control	
			szkło % glass %	PS % PS %	szkło % glass %	PS % PS %
			Tworzywo siarkowe SK Sulphur material SK	120 240	147 ± 1,70 144 ± 4,25	1 3
Tworzywo siarkowe SW Sulphur material SW	120 240	264 ± 4,12 305 ± 5,26	-- --	-- --	78 106	-- --
PS Kontrola / PS Control Szkło / glass	-- --	273 ± 18,50 148 ± 16,45	-- --	46 --	-- 84	-- --

**TABELA 2. Czas krzepnięcia krwi cytrynianowej po kontakcie z tworzywem siarkowym mierzony w próbówce.**

**TABLE 2. Citrate blood coagulation time after contact with sulphur material measured in a test-tube.**

slow. The coagulation time was shortened by 7% in comparison with the PS surface. On the surface of smooth polished sulphur material the blood drop was also ball-shaped. The coagulation time was prolonged by 19% in relation to PS, by 29% in comparison with material SK and by 162% - with the glass surface (TABLE 3).

On the basis of the obtained results of the investigations, it was observed that sulphur material, depending on the



Rodzaj materiału Kind of the material	Czas kontaktu Contact Time [s]	Czas krzepnięcia Coagulation time [s]	Skrócenie czasu krzepnięcia w stosunku do kontroli Shortening of coagulation time in relation to control		Wydłużenie czasu krzepnięcia w stosunku do kontroli Prolongation of coagulation time in relation to control	
			szkło % glass %	PS % PS %	szkło % glass %	PS % PS %
			Tworzywo siarkowe SK Sulphur material SK	120	373 ± 46,78	--
Tworzywo siarkowe SW Sulphur material SW	120	483 ± 90,23	--	--	162	19
PS kontrola / PS control Szkło / Glass	120	403 ± 62,57	--	--	119	--
	120	184 ± 11,21	--	148	--	--

**TABELA 3. Czas krzepnięcia krwi na powierzchni tworzywa siarkowego.**  
**TABLE 3. Blood coagulation time on the sulphur material surface.**

godz. i 4 godz. w temp. 37°C. Czas krzepnięcia krwi po uwapnieniu, stwierdzony dla tworzyw siarkowych porównano z czasem krzepnięcia na powierzchni PS oraz szklanej.

Dla tworzywa siarkowego SK stwierdzono skrócenie czasu krzepnięcia średnio o 44% w porównaniu do kontroli PS oraz do tworzywa siarkowego SW. Czas krzepnięcia był zbliżony do wartości stwierdzonej na powierzchni szklanej.

Dla tworzywa siarkowego SW czas krzepnięcia krwi był wydłużony w stosunku do tworzywa siarkowego SK oraz porównywalny do wartości stwierdzonej dla powierzchni PS (TAB. 2).

Obserwację formowania się skrzepu oraz pomiar czasu krzepnięcia wykonano na próbkach w postaci płytek. Na powierzchnię próbek nanoszono pełną krew i obserwowano jej kształt. Następnie mierzono czas rekalkynacji krwi. Na powierzchni tworzywa siarkowego SK gładkiej, polerowanej, kropla krwi miała kształt kulisty. Krzepnięcie krwi zachodziło powoli. Czas krzepnięcia był skrócony o 7% w porównaniu do powierzchni PS, a wydłużony o 102% w stosunku do powierzchni szklanej. Na powierzchni tworzywa siarkowego SW gładkiej, polerowanej kropla krwi miała również kształt kulisty. Czas krzepnięcia krwi był wydłużony o 19% w stosunku do PS, o 29% w porównaniu do tworzywa SK, a o 162% do powierzchni szklanej (TAB.3).

Na podstawie otrzymanych wyników badań stwierdzono, że tworzywo siarkowe w zależności od składu i rodzaju przygotowanych próbek wykazywało zróżnicowane oddziaływanie na elementy morfotyczne krwi i krzepnięcia krwi.

Działanie hemolityczne tworzywa siarkowego SK znalazło potwierdzenie w ocenie morfologicznej krwinek czerwonych oraz w zwiększonym stężeniu pozakrwinkowej hemoglobiny w osoczu krwi. Próbkę siarkowych SK w postaci sześcianów, które były całkowicie zanurzone w krwi, wywołały aktywację procesu krzepnięcia. Potwierdzeniem tego procesu był utworzony skrzep wokół próbki. Na powierzchni próbek w postaci płytek, formowanie się skrzepu następowało powoli. Proces krzepnięcia krwi był wydłużony. Tworzywo siarkowe SW przy dłuższym kontakcie z krwią powodowało wzrost stężenia hemoglobiny w osoczu jak i zmiany morfologiczne komórek krwi. Czas krzepnięcia krwi mierzony po pełnym zanurzeniu w niej próbek i czasowym kontakcie jak i na powierzchni był wydłużony w porównaniu do tworzywa siarkowego SW.

## Wnioski

1. Tworzywo siarkowe SK (siarka, krzemionka, wapień) w postaci kostek sześciennych wykazuje toksyczne działanie na składniki morfotyczne krwi oraz powoduje skrócenie czasu krzepnięcia krwi.

composition and the kind of the prepared samples, showed differentiated reaction on the morphotic elements and coagulation of blood.

Haemolytic reaction of sulphur material SK was confirmed in morphological evaluation of red cells and in increased haemoglobin concentration in plasma. Sulphur samples SK in the shape of cubes completely immersed in blood caused the activation of coagulation process. The clot formed around the sample was the confirmation of this process. On the surface of the plate - shaped samples the clot formation was slow. The blood coagulation process was prolonged. Sulphur material SW caused increase of haemoglobin concentration and morphological changes of blood cells during a longer contact with blood. The blood coagulation time measured at complete immersing of the samples in blood and a temporal contact as well as on the surface was prolonged in comparison with sulphur material SW.

## Conclusions

1. Sulphur material SK (sulphur, silica, calcite) in the shape of cubes showed toxic reaction on the morphotic components of blood causes shortening of the coagulation time.
2. The surface of the plates of sulphur material SK prolongs the process of blood coagulation.
3. Sulphur material SW (sulphur, silica, coal - soot) during prolonged contact with blood shows toxic reaction on the blood components.
4. Sulphur material SW prolongs the blood coagulation process.

## Acknowledgement

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

## Piśmiennictwo

## References

- [1] Luboz M. P.: Experimental device for the evaluation of blood compatibility of various materials. W: Vincenzini P.: Ceramics in Surgery. Elsevier Sci. Pub. Co., 1983.
- [2] Basmandjan D., Sefton M., V., Baldwin S.A.: Coagulation on biomaterials in flowing blood: some theoretical considerations. 1997, 18, 1511-1522.
- [3] Yayapour N., Nygren H.: Interactions between whole blood and hydrophilic or hydrophobic glass surfaces: kinetics of cell adhesion, colloids and surfaces. Biointerfaces, 1999, 15, 127-138.
- [4] Delignani D.D.: Effect of surface roughness of hydroxyapatite on human bone marrow cell adhesion, proliferation, differentiation and detachment strength. Biomaterials, 2001, 22, 87-96.
- [5] 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.
- [6] Paluch D., Szymonowicz M., Pielka S., Rutowski R.: Badania in vitro wpływu materiałów poliestrowych o różnym stopniu zwil-



2. Powierzchnia płytek tworzywa siarkowego SK wydłuża proces krzepnięcia krwi.
3. Tworzywo siarkowe SW ( siarka, krzemionka, węgiel-sadza ), przy dłuższym kontakcie z krwią, wykazuje działanie toksyczne na składniki krwi.
4. Tworzywo siarkowe SW, wydłuża proces krzepnięcia krwi.

## Podziękowanie

Praca finansowana w ramach grantu KBN Nr 7 TO8D 016 18.

żalności na parametry układu krzepnięcia i fibrylizacji. Polim. w Med., 32,1-2, 41-64.

[7] PN-EN ISO 10993-12:2002 Biologiczna ocena wyrobów medycznych. Część 12 : Przygotowanie próbek i materiałów odniesienia.

[8] PN-EN ISO 10993-1:2001 Biologiczna ocena wyrobów medycznych - Ocena i badania.

[9] PN-EN ISO 30993-4:2002 Biologiczna ocena wyrobów medycznych - część 4 Wybór badań interakcji z krwią.

[10] 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.

[11] Bomski H: Podstawowe badania hematologiczne. WL PZWL Warszawa 1995.

[12] Dąbrowski Z.: Fiziologia krwi. Wybrane zagadnienia cz. 1. 2. Wydawnictwo Naukowe PWN Warszawa 1998.

[13] Krzemińska - Ławkowiczowa I Maj S.: Atlas hematologii klinicznej. WL PZWL Warszawa 1993.

## WPŁYW BIOMATERIAŁÓW NA SYNTEZĘ CYTOKIN PROZAPALNYCH W LEUKOCYTACH LUDZKIEJ KRWI OBWODOWEJ

STANISŁAW PIELKA\*, ANNA CZARNY\*\*, BOGUSŁAWA ŻYWICKA\*,  
EWA ZACZYŃSKA\*\*, LESZEK SOLSKI\*, DANUTA PALUCH\*,  
JOLANTA STANISZEWSKA-KUŚ\*

\*ZAKŁAD CHIRURGII EKSPERYMENTALNEJ I BADANIA BIOMATERIAŁÓW  
AKADEMII MEDYCZNEJ WE WROCŁAWIU

\*\* INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ PAN WE  
WROCŁAWIU

### Wprowadzenie

Materiały biomedyczne o wysokim stopniu biogodności, i produkty ich biodegradacji, nie powinny wywierać wpływu na układ immunologiczny organizmu, bowiem pobudzenie układu immunologicznego może nasilać procesy zapalne, a także wyzwolić reakcje alergiczne. Są to zjawiska niekorzystne zarówno w przypadku krótkotrwałego kontaktu biomateriału z tkankami, ale przede wszystkim dla długotrwałego utrzymania wszczepu w organizmie. Dotychczas nie w pełni poznanym zjawiskiem jest wpływ biomateriałów na produkcję i uwalnianie mediatorów zapalenia, takich jak: czynnika martwicy guza (TNF- $\alpha$ ) najwcześniej występującego w ognisku zapalnym, a także interferonów (IFN) aktywujących makrofagi i fagocytozę. Obecność cytokin prozapalnych powoduje wzrost poziomu NO, który w małych ilościach pełni funkcje ochronną, natomiast w wysokim stężeniu wywiera działanie cytotoksyczne na komórki. Prześledzenie stymulacji tych mediatorów (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , NO) może udzielić odpowiedzi o potencjalnej wczesnej i późnej reakcji tkankowej na nowe biomateriały i okazać się czułym testem do praktycznej selekcji materiałów.

## THE INFLUENCE OF THE BIOMATERIALS FOR THE PROINFLAMMATORY CYTOKINES SYNTHESIS IN HUMAN LEUKOCYTES FROM PERIPHERAL BLOOD

STANISŁAW PIELKA\*, ANNA CZARNY\*\*, BOGUSŁAWA ŻYWICKA\*,  
EWA ZACZYŃSKA\*\*, LESZEK SOLSKI\*, DANUTA PALUCH\*,  
JOLANTA STANISZEWSKA-KUŚ\*

\*MEDICAL ACADEMY IN WROCLAW, INSTITUTE OF EXPERIMENTAL  
SURGERY AND BIOMATERIALS RESEARCH, WROCLAW, POLAND,

\*\*INSTITUTE OF IMMUNOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPY, POLISH  
ACADEMY OF SCIENCES, WROCLAW, POLAND

### Introduction

Medical materials of the high level biocompatibility and products of their biodegradation should not have any influence on the immunological system of organism, because such stimulation may cause the increase of inflammatory reactions as well as to provoke the allergic reactions. Such reaction are unfavourable in both cases, for short-time contact biomaterials but specially for all implanted materials, which stayed for long time in the body. As for today we do not know too much about the influence of biomaterials on the production and releasing of inflammatory mediators, such as tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ), which are present in inflammatory site during the early stage, and such as interferons which activates macrophags and phagocytosis. The presence of pro-inflammatory cytokines caused the increase of nitric oxide, which itself in small quantities has the protective function, but in higher concentrations has the cytotoxic effect on the cells. The monitoring of the stimulation of these mediators could give us the answer about the potential, early and late tissue reaction for the new biomaterials and it could prove to be the sensitive test for practical selection of materials.