

Podsumowanie

Stabilność natywnych i modyfikowanych tkanek określana jest często na podstawie ich podatności na trawienie enzymatyczne. Wrażliwość tkanki na aktywność proteaz może być wykorzystana do oceny stopnia jej sieciowania jak również denaturacji [9,11].

W niniejszej pracy wykorzystano jakościową analizę profili elektroforetycznych białek uwalnianych z tkanek osierdzia świni do oceny efektu ich modyfikacji chemicznej.

Wykazano, że właściwości biochemiczne tkanek modyfikowanych z użyciem glutaraldehydu (GA) lub formaldehydu (FA) różniły się od właściwości tkanki natywnej. Profile elektroforetyczne (RYS.1) tkanek modyfikowanych wskazują na ich większą odporność na trawienie enzymatyczne (pankreatyna), w porównaniu z tkanką natywną. Ekstrakcja z tkanek modyfikowanych mniejszych ilości białek niskocząsteczkowych (TAB.1) świadczy o ich silniejszym sieciowaniu. Ponadto stwierdzono, że wydłużenie czasu modyfikacji powodowało wzrost stabilności utrwalań tkanek.

Podziękowanie

Praca finansowana przez Śląską Akademię Medyczną.

ZMIANY NAPRĘŻENIA W TKANCE OSIERDZIA PODCZAS JEJ MODYFIKACJI KWASEM TANINOWYM

BEATA C WALINA*, ARTUR TUREK*, MARIA JASTRZĘBSKA*, ANETA FLUDER*, PAWEŁ KOSTKA**

*KATEDRA BIOFIZYKI,
ŚLĄSKA AKADEMIA MEDYCZNA, SOSNOWIEC

**FUNDACJA ROZWOJU KARDIOCHIRURGII,
ZABRZE

Streszczenie

Badano zmiany naprężenia powstające w tkance osierdzia włóknistego świni podczas jej sieciowania za pomocą kwasu taninowego (TA). Równocześnie analizowano wpływ czasu modyfikacji na właściwości wytrzymałościowe biomateriału tkankowego. Stwierdzono, że proces modyfikacji tkanki osierdzia za pomocą TA przebiegał w trzech etapach, odzwierciedlonych przez zmiany wielkości naprężeń powstających w tkance. Wyniki sugerują, że naprężenia te mogą decydować o stabilności mechanicznej biomateriałów w warunkach in vivo. Czas modyfikacji tka-

Piśmiennictwo

References

67

- [1] Cwalina B., Turek A., Sliupkas - Dyrda E., Nawrat Z. Effect of tissue - stabilization on electrophoretic profiles of proteins extracted from porcine pericardium. *Engineering of Biomaterials*. 2001; 17 - 19: 89-91.
- [2] Gianazza E., Osio L., Grazioli G., Astrua-Testori S., Righetti P.G., Accinni R., Renoldi I., Repossini A. An examination of heart proteins by two-dimension electrophoresis. *Clin. Chem*. 1987; 33: 2011-2018.
- [3] James V.J., McConnell J.F., Capel M. The d-spacing of collagen from mitral valve changes with ageing, but not with collagen type III content. *Biochim. Biophys. Acta*, 1991; 1078: 19-22.
- [4] Jayakrishnan A., Jameela S.R. Glutaraldehyde as a fixative in bioprostheses and drug delivery matrices. *Biomaterials*. 1996; 17: 471-484.
- [5] Khor E. Methods of the treatment of collagenous tissues for bioprostheses. *Biomaterials*. 1997; 18: 95-105.
- [6] Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature*, 1970; 227: 680-685.
- [7] Moczar M., Leceref L., Ginat M., Loisanse D. Complement Activation Is Involved in the Structural Deterioration of Bovine Pericardial Bioprosthetic Heart Valves. *Asaio Journal*. 1996; 42: M 375 - M381.
- [8] Moore M.A., Bohachevsky I.K., Cheung D.T., Boyan B.D., Chen W-M, Bickers R.R., McLroy B.K. Stabilization of pericardial tissue by dye-mediated photooxidation. *J. Biomed. Mater. Res*. 1994; 28: 611-618.
- [9] Moore M.A., Philips R.E. Biocompatibility and immunogenic properties of pericardial tissue stabilized by dye-mediated photooxidation. *J. Heart. Valve. Dis*. 1997; 6: 307-315.
- [10] Shen M., Carpentier S.M., Cambillau M., Chen L., Martinet B., Carpentier A. Protein adsorption in glutaraldehyde-preserved bovine pericardium and porcine valve tissue. *Ann. Thorac. Surg*. 2001; 71(5 Suppl): 408-409.
- [11] Weadock K.S., Miller E.J., Keuffel E.L., Dunn M.G. Effect of physical crosslinking methods on collagen-fiber durability in proteolytic solutions. *J. Biomed. Mater. Res*. 1996; 32: 221-226.
- [12] Xu Ch., Lee S., Singh T.M., Sho E., Li X., Sho M., Masuda H., Zarins Ch. Molecular mechanisms of aortic wall remodeling in response to hypertension. *J. Vasc. Surg*. 2001; 33: 570-578.

STRESS CHANGES IN PERICARDIUM TISSUE DURING ITS MODIFICATION WITH TANNIC ACID

BEATA C WALINA*, ARTUR TUREK*, MARIA JASTRZĘBSKA*, ANETA FLUDER*, PAWEŁ KOSTKA**

*DEPARTMENT OF BIOPHYSICS,
MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA, SOSNOWIEC

**FOUNDATION FOR DEVELOPMENT OF CARDIAC SURGERY,
ZABRZE

Abstract

Stress changes arising in fibrous pericardium tissue during its crosslinking by means of tannic acid (TA) have been investigated. The influence of modification time on mechanical properties of tissular biomaterial has been analyzed simultaneously. It has been found that the process of the pericardium tissue modification with TA took place in three stages, reflected by changes in quantity of stresses originated in tissue. The results suggest that these stresses may determine mechanical stability of biomaterials under in vivo conditions. Obtaining the biomaterial possess-

nek warunkuje otrzymanie biomateriału o określonych właściwościach wytrzymałościowych. Procedura badań wytrzymałościowych zastosowana w tej pracy może być przydatna w doborze substancji sieciującej, a także w optymalizacji warunków utrwalania tkanek osierdzia (czas, temperatura, stężenia odczynników).

Słowa kluczowe: sieciowanie tkanek, osierdzie, kwas taninowy, właściwości wytrzymałościowe

Wprowadzenie

Rola tkanek łącznych w organizmach ssaków jest wieloraka. Przede wszystkim zapewniają one tkankom i narządom wytrzymałość mechaniczną [9]. Biologiczne i fizykochemiczne właściwości tkanek takich jak worek osierdzio- wy lub zastawki serca powodują, że są one użyteczne w inżynierii biomateriałów. Modyfikowane tkanki, zarówno ludzkie, jak i zwierzęce, są stosowane w kardiologii i chirurgii naczyń krwionośnych [5, 8].

Zasadniczy wpływ na mechanikę tkanek mają białka włók- niste, głównie kolagen i elastyna. Glikozaminoglikany (GAG) warunkują uwodnienie przestrzeni wokół białek struktural- nych, co wpływa na prawidłowe współdziałanie białek hydrofilowych (kolageny) z białkiem hydrofobowym (elasty- na) [9].

Tkanki łączne wykorzystywane w bioprotetyce poddawa- ne są modyfikacji. Jej celem jest zachowanie lub zwięks- szenie stabilności mechanicznej i biochemicznej biomate- rialów w warunkach in vivo. Modyfikacja polega na wpro- wadzeniu egzogennych wiązań sieciujących do struktury tkanki za pomocą różnych czynników fizycznych (naświe- tlanie) i/lub chemicznych (aldehid glutarowy, GA) [4-8]. Od- czynniki chemiczne ulegają zwykle wbudowaniu w struktu- rę tkanki. Zmiany strukturalne zachodzące w utrwalonym biomateriale dotyczą zarówno białek, jak i innych składni- ków tkanki, np. GAG. Komercyjnie do stabilizacji tkanek wykorzystuje się GA, jednakże tak modyfikowane tkanki okazały się niewystarczająco trwałe [3,5,11]. Istnieją ten- dencje do zastępowania GA substancjami pochodzenia naturalnego, takimi jak kwas taninowy (TA) [2] lub genipi- na [10].

Podczas badań prowadzonych w Katedrze Biofizyki ŚAM obserwowano między innymi sztywnienie i kurczenie się tkanek osierdzia modyfikowanych za pomocą GA [1].

Celem tej pracy było zbadanie naprężeń powstających w tkance osierdzia włóknistego podczas jej sieciowania za pomocą kwasu taninowego (TA). Badano przy tym, w ja- kim stopniu czas modyfikacji wybranym czynnikiem sieci- jącym wpływa na właściwości wytrzymałościowe biomate- rialu tkankowego.

Materiały i metody

Badano tkanki osierdzia włóknistego świni, pobierane bezpośrednio po uboju zwierząt. Tkanki płukano w schłod- zonym (4°C) roztworze solanki buforowanej fosforanami (phosphate-buffered saline; PBS; pH 6,5) i następnie umieszczane w butelkach zawierających ten sam bufor. Butelki transportowano w pojemniku chłodzonym lodem. Z każdego worka osierdzio- wego oddzielano mechanicznie osierdzie włókniste, z którego usuwano ostrożnie tkankę tłuszczową. Oczyszczone tkanki osierdzia cięto wzdłuż włók- ien na paski o wymiarach 25×10×0,2 mm, które podda- wano badaniom wytrzymałościowym w Pracowni Biocyber- netyki Fundacji Rozwoju Kardiologii w Zabrze. Pomia- ry wykonywano z zastosowaniem specjalnie skonstruowa- nego układu, który składał się z profesjonalnego miernika siły Advanced Force Gauge-AFG 25N firmy Mecmesin, umieszczonego na ruchomym ramieniu statywu elektrome-

ing specific mechanical properties is conditioned by the modification time. Procedure of mechanical in- vestigations used in this work may be helpful for the crosslinking substance selection and also for optimi- zation of the pericardial tissues-fixation circumstances (time, temperature, concentration of reagents).

Key words: tissue crosslinking, pericardium, tan- nic acid, mechanical properties

Introduction

The role of connective tissues in mammalian organisms is manifold. First of all they provide tissues and organs with mechanical strength [9]. Biological and physicochemical properties of tissues such as pericardial sac or heart valves caused that they are useful in the biomaterial engineering. Modified tissues, both human and animal, are used in car- diac and blood-vessel surgery [5,8].

The tissues mechanics is essentially influenced by fibrous proteins, mainly collagen and elastin. Hydration of space around structural proteins is conditioned by glycosamino- glycans (GAG) influencing proper co-operation of hydro- philic proteins (collagens) with hydrophobic protein (ela- stin) [9].

The connective tissues used in bioprosthesis are subjec- ted to modification with the aim of the preservation or in- crease of the biomaterials mechanical and biochemical in vivo stability. Modification consists in introduction into tis- sular structure of exogenic crosslinking bonds by means of various agents: physical (lighting) and/or chemical (gluta- raldehyde, GA) [4-8]. The chemical reagents are usually incorporated into the tissue structure. Structural changes taking place in fixed biomaterial concern both proteins as well as the tissue other components, for example GAG. Commercially, GA is used for the tissues stabilization, al- though this way modified tissues proved insufficiently per- sistent [3,5,11]. There are tendencies to substitution of GA with substances of natural origin such as tannic acid (TA) [2] or genipin [10].

During the investigations carried out in Department of Bio- physics of Medical University of Silesia, stiffening and shrin- kage of the GA-modified pericardium tissues have been observed among other things [1].

The aim of this work was to investigate stresses arising in fibrous pericardium tissue during its crosslinking by means of tannic acid (TA). It has been studied simultaneously how far mechanical properties of tissular biomaterial are influ- enced by time of its modification with selected crosslinking agent.

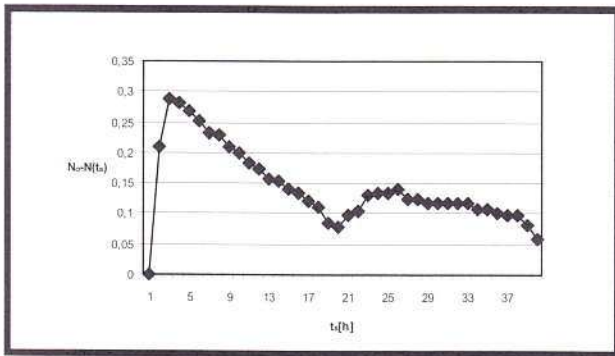
Materials and methods

Investigated were fibrous porcine pericardium tissues sampled directly after slaughtering of animals. Tissues were rinsed in cooled (4°C) solution of phosphate-buffered sa- line (PBS; pH 6,5) and then placed in bottles containing this same buffer. The bottles were transported in ice-cooled container. The fibrous pericardium was mechanically sepa- rated from each pericardial sac and the fatty tissue was carefully removed. The cleaned pericardium-tissues were cut on the 25×10×0,2 mm pieces which were subjected to mechanical testing in Laboratory of Biocybernetics of Foun- dation for Development of Cardiac Surgery in Zabrze. Meas- urements have been carried out using specially constructed system which consisted of professional tensiometer Ad- vanced Force Gauge-AFG 25N (produced by Mecmesin) positioned on the mobile arm of electromechanical stand. The mobile arm has been positioned mechanically by means of computer-controlled step motor. Measurements have been carried out in vessel filled with the 2% tannic

chanicznego. Położenie ruchomego ramienia ustawiano mechanicznie, za pomocą silnika krokowego sterowanego komputerem. Pomiary wykonywano w naczyniu wypełnionym 2% wodnym roztworem kwasu taninowego (TA) jako odczynnikami sieciującym. Chwilowe wartości siły naprężającej mierzono w odstępach 0,1s.

Wyniki

Jako miarę sił wewnętrznych działających w tkance podczas jej sieciowania za pomocą TA przyjęto obliczone wielkości naprężenia N tkanki, znormalizowane względem wielkości naprężenia początkowego $[N=N_0-N(ts)]$. Przykładowy wykres ilustrujący zmiany naprężeń powstających w tkance osierdzia podczas jej sieciowania przedstawiono na RYS.1.



RYS.1. Zmiany naprężeń powstających w tkance osierdzia podczas jej sieciowania z użyciem roztworu kwasu taninowego (TA).

FIG.1. Stress changes arising in the pericardium tissue during its crosslinking by means of tannic acid (TA) solution.

Dyskusja

Długotrwałe procesy modyfikacji mogą wpływać na stabilność mechaniczną biomateriałów po ich wszczepie. Oddziaływania tkanki z roztworem wodnym i czynnikiem sieciującym mogą doprowadzić do niekorzystnych naprężeń (zbyt duża gęstość wiązań sieciujących) lub też nadmiernego uplastycznienia materiału wskutek zmian jego właściwości biologicznych i fizykochemicznych. Uplastycznienie biomateriału może być związane ze zmianą hydratacji struktury tkanki, będącej skutkiem oddziaływań woda - GAG.

Badania wytrzymałościowe wykorzystywane są do oceny efektów stabilizacji tkanek, ponieważ odzwierciedlają zmiany ich wewnętrznej struktury [11].

W niniejszej pracy badano naprężenia powstające w tkance osierdzia włóknistego podczas jej sieciowania za pomocą kwasu taninowego (TA). Równocześnie analizowano wpływ czasu modyfikacji na właściwości wytrzymałościowe biomateriału tkankowego.

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że proces modyfikacji tkanki osierdzia za pomocą TA przebiega w trzech etapach. Pierwszy etap jest związany z dynamicznym sieciowaniem białek włóknistych. Ich krótkotrwała modyfikacja (<4h) przyczynia się do uzyskania zwartej struktury tkanki, co ujawnia się jako wzrost naprężenia N . Podczas drugiego etapu, widocznego jako spadek wartości N , najprawdopodobniej następuje uplastycznienie tkanki wskutek pochłaniania wody przez GAG. Skutkiem zatrzymania procesu sieciowania na tym etapie będzie uzyskanie biomateriału wykazującego zdolność przyjmowania nowego kształtu, bez naruszenia spójności strukturalnej.

acid (TA) water-solution as the crosslinking agent. Temporary values of tensile force have been measured in intervals 0,1s.

Results

As measure of internal forces acting in the tissue during its crosslinking by means of TA, the calculated values of the tissue stress-intensity (N), normalized in relation to the initial stress value $[N=N_0-N(ts)]$, have been accepted. An example of diagram illustrating stress changes arising in the pericardium tissue during its crosslinking has been presented in FIG.1.

Discussion

Long-term processes of modification may influence the mechanical stability of biomaterials after their implantation. The tissue interaction with water solution and crosslinking agent may leads to unfavourable stresses (too much density of cross-links) or also excessive plastifying of material due to changes in its biological and physico-chemical properties. The biomaterial plastifying may be connected with change of the tissue structure-hydration being a result of the water-GAG interaction.

Mechanical investigations are used for estimation effects of the tissues stabilization because of reflecting changes in their internal structure [12].

In present work stresses arising in fibrous pericardium tissue during its crosslinking by means of tannic acid (TA) have been investigated. The influence of modification time on mechanical properties of tissular biomaterial has been analyzed simultaneously.

Based on obtained results, it has been found that the process of the pericardium tissue modification with TA take place in three stages. The first is connected with dynamic crosslinking of fibrous proteins. Their short-term modification (<4 h) contributes to obtaining the tissue compact structure which is reflected by increase in the stress N . During second stage, reflected by the N -value decrease, the tissue-plastifying due to the water absorption by GAG takes place most likely. An effect of the crosslinking process stoppage at this stage will be obtaining the biomaterial indicating ability to assume new form, without disturbance the structural cohesion. The last stage of the modification process, characterized by the lowest dynamics of the N -value changes, follows after achieving the tissue maximum hydration (min. N). Crosslinked are low-molecular proteins and/or proteins contained in areas making TA-penetration difficult. An effect of the modification-time prolongation is stronger crosslinking of obtained biomaterial.

Summary

The results obtained in present work suggest that quantity of stresses arising in porcine pericardium tissue during its modification by means of tannic acid (TA) may determine mechanical stability of biomaterials under in vivo conditions. Obtaining the biomaterial possessing specific mechanical properties is conditioned by the modification time. Procedure of mechanical investigations used in this work may be helpful for the crosslinking substance selection and also for optimization of the pericardial tissues-fixation circumstances (time, temperature, concentration of reagents).

Acknowledgements

This work was financially supported by Medical University of Silesia.

Po osiągnięciu maksymalnego uwodnienia tkanki (min. N) następuje ostatni etap procesu modyfikacji, charakteryzujący się najmniejszą dynamiką zmian N. Sieciowaniu ulegają białka niskocząsteczkowe i/lub białka zawarte w obszarach o utrudnionej penetracji TA. Skutkiem wydłużenia czasu modyfikacji tkanek jest silniejsze usieciowanie używanego biomateriału.

Podsumowanie

Wyniki uzyskane w niniejszej pracy sugerują, że wielkości naprężeń powstających w tkance osierdzia świni podczas jej modyfikacji za pomocą TA mogą decydować o stabilności mechanicznej tak wytworzonych biomateriałów w warunkach in vivo. Czas modyfikacji tkanek warunkuje otrzymanie biomateriału o określonych właściwościach wytrzymałościowych. Zastosowana procedura badań wytrzymałościowych może być przydatna w doborze substancji sieciującej, a także w optymalizacji warunków utrwalania tkanek osierdzia (czas, temperatura, stężenia odczynników).

Podziękowanie

Praca finansowana przez Śląską Akademię Medyczną.

NIEMETALICZNY KOMPOZYTOWY IMPLANT DLA REKONSTRUKCJI TCHAWICY - BADANIA WSTĘPNE

SCIERSKI T.*,, PILCH J.* , BŁAŻEWICZ S.** , KONIECZNA B**

*I ENT KLINIKA, ŚLĄSKA AKADEMIA MEDYCZNA, KATOWICE

**WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI,
AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA W KRAKOWIE

Streszczenie

Powodzenie w rekonstrukcjach laryngologicznych z zastosowaniem implantu ogranicza fakt, że charakterystyka biomechaniczna zastępowanej tkanki znacznie różni się od materiału syntetycznego. Praca poświęcona jest ocenie złożonej charakterystyki mechanicznej naturalnej tchawicy w celu opracowania odpowiedniego tworzywa do jej rekonstrukcji. Próbkę tkanki wyciętą z tchawicy były również poddane badaniom. Wyniki badań wykazały znaczącą anizotropię właściwości mechanicznych tchawicy. Do

Piśmiennictwo

References

- [1] Cwalina B., Wilczok T., Bogacz A., Pawlus-Lachecka L., Nawrat Z., Religa Z. Physical properties of native and chemically modified pericardial tissues. Abstr. 3rd Congress of Chemical Technology "The Chemical Technology at the Change of the Century" (2000) Gliwice, p. 213.
- [2] Heijmen F.H., du Pont J.S., Middelkoop E., Kreis R.W., Hoekstra M.J. Cross-linking of dermal sheep collagen with tannic acid. *Biomaterials* (1997) 18: 749-754.
- [3] Jayakrishnan A., Jameela S.R. Glutaraldehyde as a fixation in bioprotheses and drug delivery matrices. *Biomaterials* (1996) 17: 417-484.
- [4] Jorge-Herrero E., Fernandez P., Turnay J., Olmo N., Calero P., Garcia R., Freile I. Influence of different chemical cross-linking treatments on the properties of bovine pericardium and collagen. *Biomaterials* (1999) 20: 539-545.
- [5] Khor E. Methods for the treatment of collagenous tissue for bioprothesis. *Biomaterials* (1997) 8: 95-105.
- [6] Moore M.A. Pericardial tissue stabilized by dye-mediated photooxidation. A review article. *J. Heart Valve Disease* (1997) 6: 521-526.
- [7] Nimni M.E., Cheung D., Strates B., Kodama M., Sheikh K. Chemically modified collagen: a natural biomaterial for tissue replacement. *J. Biomed. Mater. Res.* (1987) 21: 741-771.
- [8] Schmidt C.E., Baier J.M. Acellular vascular tissues: natural biomaterials for tissue repair and tissue engineering. *Biomaterials* (2000) 21: 2215-2231.
- [9] Stevens, Lowe. *Histologia*. PZWL (2000) Warszawa
- [10] Sung H.W., Chang Y., Chiu C.T., Chen C.N., Liang H.C. Crosslinking characteristics and mechanical properties of bovine pericardium fixed with a naturally occurring crosslinking agent. *J. Biomed. Mater. Res.* (1999) 47: 116-120.
- [11] Thoma R.J., Phillips R.E. The role of materials surface chemistry in implant device calcification: a hypothesis. *J. Heart. Valve Dis.* (1995) 4: 214-221.
- [12] Weadock K.S., Miller E.J., Keuffel E.L., Dunn M.G. Effect of physical crosslinking methods on collagen-fiber durability in proteolytic solutions. *J. Biomed. Mater. Res.* (1996) 32: 221-226.

NONMETALLIC COMPOSITE IMPLANT FOR TRACHEAL RECONSTRUCTION - PRELIMINARY STUDY

SCIERSKI T.*,, PILCH J.* , BŁAŻEWICZ S.** , KONIECZNA B**

*THE FIRST ENT CLINIC, SILESIAAN MEDICAL ACADEMY, KATOWICE

**FACULTY OF MATERIALS ENGINEERING AND CERAMICS,
UNIVERSITY OF MINING AND METALLURGY, AL KRAKOW

Abstract

The success of material implant in the laryngeal reconstructions is limited by the fact that the biomechanical characteristic of replaced tissue is distinctly different from synthetic material. The work is devoted to evaluation of complex mechanical characteristic of natural trachea before designing the proper synthetic substitute. Various mechanical tests were conducted to study the mechanical behavior of total trachea. Samples of tissue cut out from the trachea were also examined. The results revealed strong anisotropic mechanical properties of trachea. Composite materials made from carbon fibers and biocompatible and biostable polysulfone are consid-