

BADANIA BIOZGODNOŚCI IN VITRO POLIMERÓW KONSTRUKCYJNYCH POMPY WSPOMAGANIA SERCA RELIGA HEART EXT, PODDANYCH PROCESOWI PRZETWÓRSTWA

MAGDALENA KOŚCIELNIAK-ZIEMNIAK^{1*}, PIOTR WILCZEK²,
ROMAN KUSTOSZ¹, MAŁGORZATA GONSIOR¹

FUNDACJA ROZWOJU KARDIOCHIRURGII,
UL. WOLNOŚCI 345A, 41-800 ZABRZE, POLSKA

¹PRACOWNIA SZTUCZNEGO SERCA

²PRACOWNIA BIOINŻYNIERII

*MAILTO: MKOSCIELNIAK_ZIEMNIAK@FRK.PL

Streszczenie

Celem badań była ocena biouzgodności w testach *in vitro* polimerów konstrukcyjnych polskiej pozaustrojowej pulsacyjnej pompy wspomaganie serca Religa Heart EXT. Badaniu poddano próbki polimerów Bionate® II 90A, Bionate® II 55D i ChronoFlex® AR-LT przygotowane po procesach przetwórstwa, odpowiadających wytworzeniu pompy Religa Heart EXT. Przedmiotem badań była ocena oddziaływania polimerów na wybrane elementy komórkowe, takie jak: erytrocyty, płytki krwi i fibroblasty. Przeprowadzono testy hemolizy, trombogenności, cytotoksyczności oraz struktury chemicznej polimerów. Badania wykonano zgodnie z polską normą PN-EN ISO 10993. Rezultaty wykazały, że polimery konstrukcyjne po przetwórstwie nie oddziaływały negatywnie na elementy morfotyczne krwi, nie aktywowały płytek krwi i leukocytów oraz nie oddziaływały toksycznie na komórki fibroblastów. Ponadto, nie stwierdzono istotnych zmian w strukturze chemicznej polimerów konstrukcyjnych po procesie przetwórstwa technologicznego.

Słowa kluczowe: biouzgodność, poliwęglan uretanowy PCU, pulsacyjne pompy wspomaganie serca.
[Inżynieria Biomateriałów, 116-117, (2012), 57-61]

Wprowadzenie

Biomateriały konstrukcyjne wyrobów medycznych przeznaczonych do długoterminowego kontaktu z krwią, takich jak urządzenia wspomagające pracę serca, muszą oznaczać się najwyższą klasą biouzgodności. Powierzchnia biomateriału protezy serca kontaktując się z krwią i okolicznymi tkankami wpływa bezpośrednio na elementy morfotyczne krwi i sąsiadujące tkanki oraz pośrednio na pozostałe tkanki i narządy organizmu. Dlatego brak biouzgodności biomateriału może prowadzić do negatywnych ogólnoustrojowych reakcji organizmu. W programie „Polskie Sztuczne Serce” opracowano nową konstrukcję polskiej pozaustrojowej pulsacyjnej pompy wspomaganie serca Religa Heart EXT, przeznaczonej do wspomaganie serca przez okres kilku miesięcy [1]. Elementy konstrukcyjne pompy są zbudowane z nowoczesnych biouzgodnych poliuretanów poliwęglanowych. Polimery te podczas wytwarzania pompy poddawane są procesom przetwórstwa technologicznego metodą wtrysku wysokociśnieniowego lub metodą laminowania z roztworu. Istotny etap opracowania konstrukcji i technologii wytwarzania wyrobu medycznego stanowią badania biologiczne oceny jego biouzgodności. Wytyczne dotyczące doboru ba-

BIOCOMPATIBILITY IN VITRO INVESTIGATIONS OF RELIGA HEART EXT VENTRICULAR ASSIST DEVICE STRUCTURAL POLYMERS, TREATED WITH TECHNOLOGICAL PROCESS

MAGDALENA KOŚCIELNIAK-ZIEMNIAK^{1*}, PIOTR WILCZEK²,
ROMAN KUSTOSZ¹, MAŁGORZATA GONSIOR¹

FOUNDATION OF CARDIAC SURGERY DEVELOPMENT,
345A WOLNOŚCI STR., 41-800 ZABRZE, POLAND

¹ARTIFICIAL HEART LABORATORY,

²BIOENGINEERING LABORATORY

*MAILTO: MKOSCIELNIAK_ZIEMNIAK@FRK.PL

Abstract

The aim of the investigations was *in vitro* biocompatibility evaluation of Polish extracorporeal pulsatile ventricular assist device Religa Heart EXT structural polymers. Samples of polymers: Bionate® II 90A, Bionate® 55D and ChronoFlex® AR-LT were tested, had been treated before with technological processes matching the conditions of Religa Heart EXT pump manufacturing. The subject of the investigation was the interaction between polymers and cellular elements (erythrocytes, platelets and fibroblasts). The following tests were performed: haemolysis, thrombogenicity, cytotoxicity and chemical structure analyses. The tests were performed according to Polish standard PN-EN ISO 10993. The results revealed: no negative interaction between blood cells and structural polymers, after technological process; no activation of platelets and leukocytes, and no fibroblasts toxicity. Furthermore, no essential changes in the chemical structure of the examined polymers after technological process were observed.

Keywords: biocompatibility, PCU polycarbonate-urethane, pulsatile ventricular assist device.
[Engineering of Biomaterials, 116-117, (2012), 57-61]

Introduction

Structural biomaterials of medical devices designed for long-term contact with blood, such as heart assist devices, must be characterized by the highest class of biocompatibility. The biomaterial surface of heart prosthesis, contacting with blood and local tissues, influences directly on blood cells and surrounding tissues, as well as indirectly on the rest of human body tissues and organs. Therefore the lack of biomaterials biocompatibility can lead to negative systemic reactions. Within the “Polish Artificial Heart” project a new construction of Polish extracorporeal pulsatile ventricular assist device (Religa Heart EXT) was developed, dedicated to long term heart assistance for several months [1]. The structural pump elements are built with high-tech biocompatible polycarbonate polymers. The polymers are treated with technological processes (including: high-pressure injection either solution dipping), during pump manufacturing. The essential part of medical device construction and manufacturing process development are the biological tests of biocompatibility evaluation. Directives concerning tests selection and tests methods are described in Polish standard PN-EN ISO 10993-1-18. the new heart assist de-

dań oraz metodyki ich prowadzenia określa polska norma PN-EN ISO 10993-1-18. Przed przystąpieniem do badań in vivo oraz wprowadzeniem nowej pompy wspomaganie serca do praktyki klinicznej niezbędne jest wykonanie badań in vitro potwierdzających dobre właściwości biologiczne materiałów konstrukcyjnych nowego wyrobu medycznego. Celem przeprowadzonych badań in vitro była ocena właściwości biologicznych i chemicznych polimerów konstrukcyjnych pompy Religa Heart EXT po ich przetwórstwie.

Materialy i metody

Próbki do badań przygotowano zgodnie z wymogami określonymi dla zastosowanej techniki badawczej oraz w sposób reprezentatywny dla gotowego wyrobu medycznego. Próbki polimerów po przetwórstwie wykrojono z gotowych elementów konstrukcyjnych pompy Religa Heart EXT. Materiał badawczy kolejno płukano w wodzie destylowanej, suszono i wyjałowiono tlenkiem etylenu [2].

Badania hemolizy wykonano metodą bezpośrednią [2-3]. Krew poddawano oddziaływaniu polimerów konstrukcyjnych na specjalnym stanowisku badawczym, składającym się z cieplarki i rolkowego mieszadła hematologicznego. Badane polimery kontaktowano ze świeżą krwią ludzką konserwowaną CPDA. Celem nasilenia zjawisk oddziaływania polimeru na krew, próbki krwi z badanymi materiałami inkubowano w cieplarni, w podwyższonej temperaturze (37°C) przez okres 8 i 24 godzin.

Badania wpływu polimerów konstrukcyjnych na płytki krwi przeprowadzono z użyciem analizatora Impact-R [2,4]. Badane polimery kontaktowano z krwią ludzką w warunkach oddziaływania sił ścinających. Krew po kontakcie z powierzchnią badanych biomateriałów w teście Impact-R badano metodą cytometrii przepływowej. Powierzchnię badanych polimerów po kontakcie z krwią oceniano z użyciem mikroskopu fluorocencyjnego. Aktywność i agregację leukocytów oraz płytek krwi oceniano przy użyciu przeciwciał monoklonalnych CD 45 (leukocyty) i CD 62 (P selektyna płytek krwi).

Badania cytotoxyczności polimerów wykonano metodą bezpośrednią. W testach cytotoxyczności badane polimery poddano 24 godzinnemu kontaktowi z fibroblastami mysimi. Następnie fibroblasty barwiono jodkiem propidyny i zliczano w mikroskopie fluorocencyjnym [2].

Badaniu składu chemicznego poddano dwa biomateriały: Bionate® II 90A oraz Bionate® II 55D. Polimery poddano analizie w postaci surowców (przed procesem przetwórstwa) oraz w postaci fragmentów z elementów konstrukcyjnych pompy Religa Heart EXT, pozyskanych jako próbki materiału po przetwórstwie [2]. Wykonano analizy: magnetycznego rezonansu jądrowego NMR, spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera FTIR, różnicowej kalorymetrii skaningowej DSC oraz chromatografii żelowej GPC. Celem badań było zidentyfikowanie zmian w strukturze chemicznej polimerów, wywołanych procesem przetwórstwa.

Wyniki i dyskusja

Rezultaty badań hemolizy - potwierdzają, że polimery konstrukcyjne po przetwórstwie: Bionate® II 90A, Bionate® II 55D oraz ChronoFlex® AR-LT, badane w kontakcie z pełną krwią ludzką, nie wywołują działania hemolitycznego, nie zmieniają obrazu morfologicznego erytrocytów oraz nie wpływają istotnie na wartości parametrów układu czerwono-krwinkowego, TABELA 1. Stopień hemolizy określono na podstawie normy ASTM F 756 – 00 [3].

Badane polimery po przetwórstwie nie wykazywały istotnych cech trombogennych i aktywacji układu płytko-

vice, It is necessary, to perform the in vitro examinations, to confirm the good biological properties of new medical device structural materials, before beginning of in vitro tests and introducing the device to clinical trials. The aim of performed in vitro examinations was the evaluation of biological and chemical properties of Religa Heart EXT pump structural polymers, treated with technological process.

Material and methods

Samples for tests were prepared according to certain requirements of applied tests technique. It were prepared in the way representative for final medical device manufacturing. The samples of polymers treated with technological process were cut out from routinely produced constructional elements of Religa Heart EXT pump. Material samples were washed in distilled water, dried, and sterilized with ethylene oxide, respectively [2].

Haemolysis tests were performed applying the direct method [2-3]. The interaction between the structural polymers and blood was evaluated on the special experimental stand, consisted of an incubator and roller haemolytic mixer. Tested polymers were contacted with fresh human blood, preserved with CPDA. In order to intensify the phenomena of polymers and blood interaction, the test-tubes filled in blood and tested materials were incubated in the increased temperature (37°C) for period of 8 and 24 hours.

The examination of the polymers influence on blood platelets was performed utilizing Impact-R analyser [2,4]. Tested polymers were contacted with fresh human blood in shear stress conditions. The blood, after contact with tested polymers surface during the Impact-R test, was examined applying flow cytometry. The surface of tested polymers after contact with blood was analyzed utilizing fluorescent microscope. The activity and aggregation of leukocytes and platelets were evaluated utilizing monoclonal antibodies CD 45 (leukocytes) and CD 62 (blood platelets P-selectin).

Cytotoxicity tests were performed applying the direct method. The investigated polymers as the raw materials (before technological process) were exposed to mice fibroblasts. Then fibroblast were stained with propidium iodide and counted utilizing fluorescent microscope [2].

The chemical characteristic of two biomaterials: Bionate® II 90A and Bionate® II 55D were tested. The polymers were analyzed in form of raw material (before technological process) and in form of Religa Heart EXT structural element parts, obtained as small material samples, after technological process. The following analyses were done: nuclear magnetic resonance NMR, Fourier transform infrared spectroscopy FTIR, differential scanning calorimetry DSC and gel permeation chromatography GPC.

Results and discussion

Results of heamolysis tests indicate, that the investigated structural polymers: Bionate®II 90A, Bionate®II 55D and Chronoflex® AR-LT, examined in the contact with human blood, did not cause heamolitic effects, did not affect erythrocyte morphology and did not significantly influence on red cells system parameters, TABLE 1. Heamolysis degree was determinate on the basis of standard ASTM F756-00 [3].

The investigated polymers treated with technological process did not present significant thrombogenicity properties or platelet-leukocyte system activation (in the receptors systems: platelet CD 62P and leukocyte CD 45), FIGs. 1 a and b. The examination was carried on standing blood (not exposed to shear-stress conditions - blank), and on blood exposed to shear-stress conditions - caused by reference ma-

wo-leukocytarnego (w układach receptorowych: CD62P płytkowym i CD45 leukocytarnym), RYS.1 a i b. Badania przeprowadzono dla krwi wolnostojącej, nie poddanej ekspozycji do naprężeń ścinających - próba ślepa oraz dla krwi poddanej ekspozycji do naprężeń ścinających wywołanych przez materiał referencyjny - polistyren oraz badane biomateriały, RYS. 1 a i b.

Badania cytotoksyczności wykazały, że badane polimery konstrukcyjne po przetwórstwie: Bionate® II 90A, Bionate® II 55 D i ChronoFlex® AR-LT nie są cytotoksyczne. Ilość komórek nekrotycznych była niska i mieściła się w przedziale od 7 do 105 komórek w polu badania, RYS. 2. Komórki żywe cechowały się prawidłową morfologią, RYS. 3.

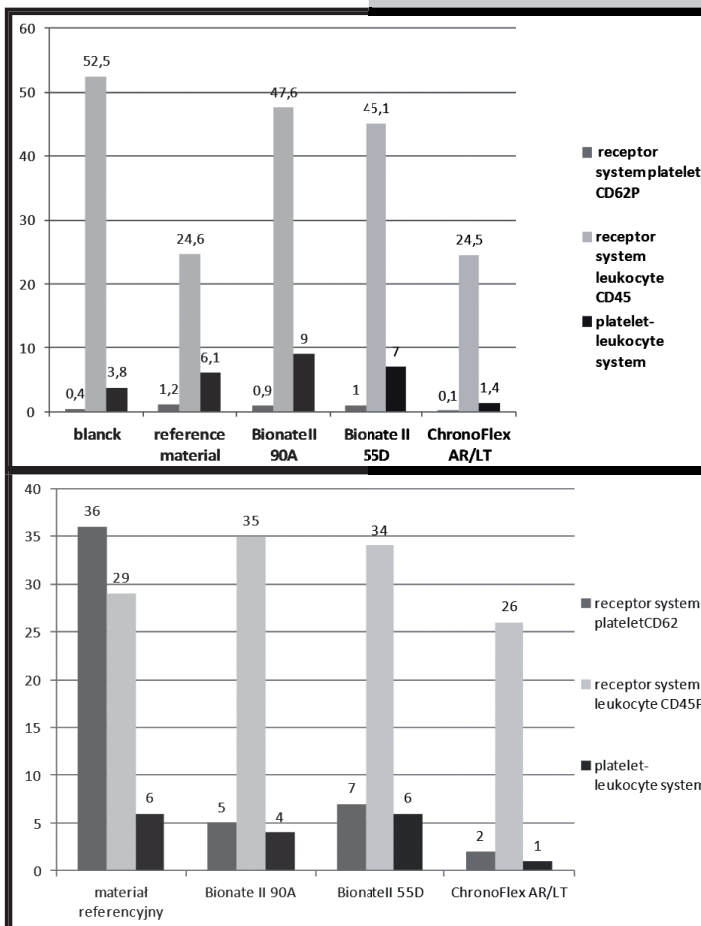
Struktura chemiczna materiału Bionate® II 90A i Bionate® II 55D, badanych w postaci surowca wyjściowego i po przetwórstwie, nie wykazała żadnych zmian pod względem grup funkcyjnych, składu pierwiastkowego i rodzaju występujących wiązań chemicznych, RYS. 4. Różnice wystąpiły w strukturze badanego związku. Polimery konstrukcyjne przed procesem przetwórstwa były częściowo (w niewielkim stopniu) krystaliczne (uporządkowane). Najmniej krystaliczny (uporządkowany) był materiał Bionate® II 90A po przetwórstwie. Próbkę surowca wyjściowego charakteryzowały się niższymi temperaturami zeszklenia niż próbki po przetwórstwie. Polimer Bionate® II 90A przed i po przetwórstwie łatwo krystalizował, w przeciwieństwie do materiału Bionate® II 55D.

Polimery Bionate® II 90A i Bionate® II 55D przed i po przetwórstwie różniły się dystrybucją wiązań wodorowych, również na powierzchni. Po przetwórstwie zmniejszyła się masa molowa i dyspersja (Mw/Mn) w porównaniu do polimerów wyjściowych obu rodzajów

Materiał badany Tested material	Czas eksperymentu Experiment duration [h]	Indeks hemolityczny Haemolysis Index [%]	Stopień hemolizy Haemolytic Grade
Bionate® II 90A	8	0,08%	Niehemolityczny / nonhaemolytic
Bionate® II 55D	8	0,11%	Niehemolityczny / nonhaemolytic
ChronoFlex®AR-LT	8	0,20%	Niehemolityczny / nonhaemolytic
Bionate® II 90A	24	0,16%	Niehemolityczny / nonhaemolytic
Bionate® II 55D	24	0,04%	Niehemolityczny / nonhaemolytic
ChronoFlex®AR-LT	24	0,03%	Niehemolityczny / nonhaemolytic

TABELA 1. Zestawienie indeksu hemolitycznego i stopnia hemolizy dla badanych biomateriałów [3].

TABLE 1. Haemolysis Index and haemolytic grade for tested biomaterials [3].



RYS. 1. Wartości median komórek CD62P, CD45 oraz agregatów leukocytarno-płytkowych po kontakcie z badanymi polimerami konstrukcyjnymi a) w cytometrii przepływowej, b) w mikroskopie fluorescencyjnym.

FIG. 1. Media values of CD62P, CD45 cells and platelet-leukocyte aggregates after contact with the investigated structural polymers, a) flow cytometry, b) fluorescence microscope.

material (polystyrene -negative control) and tested biomaterials, FIGs.1 a and b.

Cytotoxicity test confirmed, that investigated structural polymers (Bionate® II 90A, Bionate® II 55 D and Chronoflex® AR-LT) treated with the tech-

nological process, are not cytotoxic. The number of necrotic cells was low, and observed in the range from 7 to 105 cells on the examination field area, FIG.2. The vivid cells were characterized by proper morphology, FIG.3.

The chemical structure of materials (Bionate® II 90A and Bionate® II 55D), tested as a raw material as well as material after technological process, did not change, in terms of functional groups, elemental composition, and types of existing chemical bonds, FIG.4. The differences of the polymers structure were observed. The structural polymers before technological process were partially (in a small degree) crystalline (organized). Bionate®II 90A after technological process was the least crystalline material. Samples of raw materials were characterized by lower glass transition temperature, comparing to samples of materials after technological process. The Bionate®II 90A polymer before and after technological process crystallized easily, opposite to the polymer Bionate®II 55D.

Polymers (Bionate®II 90A and Bionate®II 55D) before and after technological process varied in the distribution of hydrogen bonds, on the polymer surface, as well. After technological process the molar mass and dispersion (Mw/Mn) decreased, in comparison to raw polymers of both types. The observed differences were insignificant, however to confirm these effects additional polymer tests of strength and elasticity properties should be performed.

Polymers (Bionate®II 90A and Bionate®II 55D) before and after technological process varied in the distribution of hydrogen bonds, on the polymer surface, as well. After technological process the molar mass and dispersion (Mw/Mn) decreased, in comparison to raw polymers of both types. The observed differences were insignificant, however to confirm these effects additional polymer tests of strength and elasticity properties should be performed.

badanych polimerów. Obserwowane różnice były niewielkie, jednak celem potwierdzenia zmian, planowane jest wykonanie dodatkowych badań własności wytrzymałościowych i sprężystych polimerów.

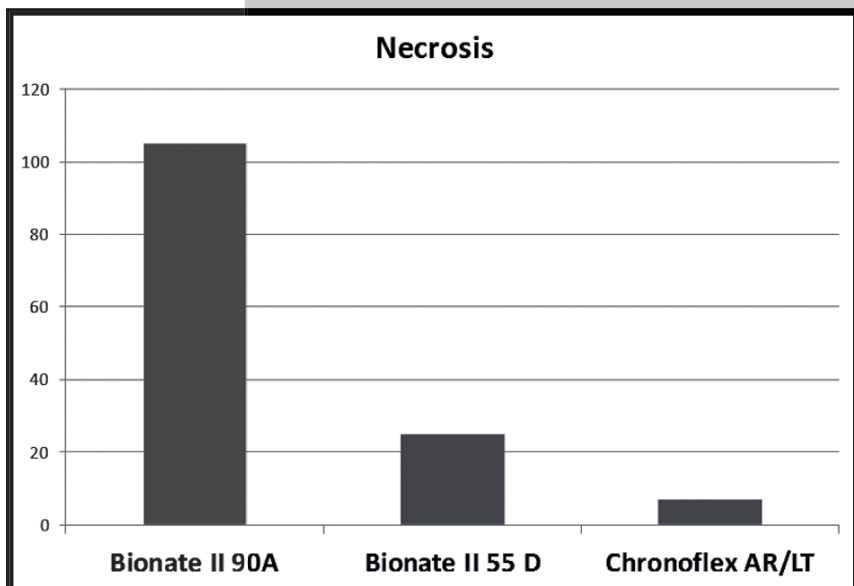
Wnioski

Przeprowadzone badania biologiczne biomateriałów, zgodnie z polską normą PN-EN ISO 10993 wykazały, że badane polimery konstrukcyjne po przetwórstwie nie oddziaływały negatywnie na elementy morfotyczne krwi, nie aktywowały w kontakcie powierzchniowym płytek krwi i leukocytów, nie powodowały cytotoxyczności komórek. Ponadto, nie stwierdzono istotnych zmian w strukturze chemicznej polimerów konstrukcyjnych przed i po procesie przetwórstwa technologicznego. Celem pełnego potwierdzenia własności biogodnych polimerów konstrukcyjnych pompy Religa Heart EXT zostaną przeprowadzone badania reakcji zapalnej i uczuleniowej oraz badania toksyczności in vivo, w doświadczeniach na zwierzętach.



RYS. 3. Ocena mikroskopowa badanych polimerów w teście cytotoxyczności bezpośredniej. Obraz mikroskopowy komórek żywych dla AR-LT, B II 55D i B II 90A.

FIG. 3. Microscopic assessment of the investigated discs in direct cytotoxicity test. Microscopic image of vivid cells for Chronoflex® AR-LT, Bionate® II 55D and 90A.

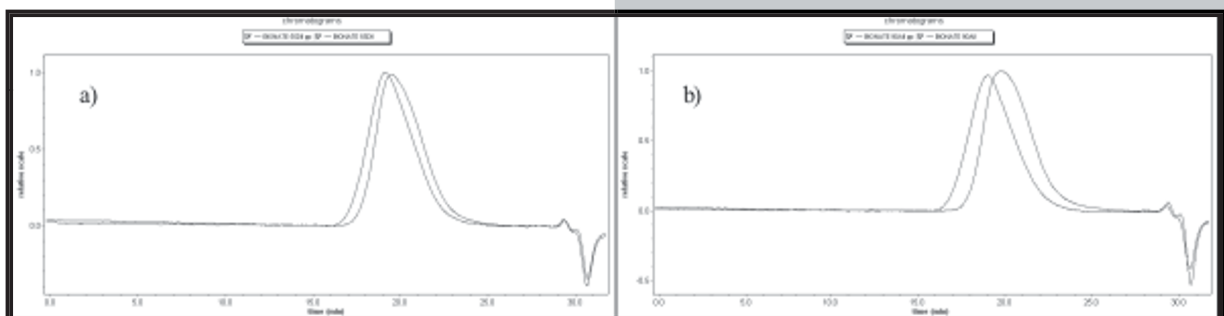


RYS. 2. Wartości bezwzględne liczby komórek nekrotycznych w teście cytotoxyczności bezpośredniej.

FIG. 2. Absolute values of necrotic cells in direct cytotoxicity test.

Conclusions

The performed biological tests of biomaterials, according to Polish Standard PN-EN 10993, proved that the investigated structural polymers did not influence negatively on the blood elements, did not activate the platelets and leukocytes in the surface contact, did not cause the cell cytotoxicity, being treated with technological process. Moreover, no significant changes in the polymers chemical structure were found, before and after technological process. In order to confirm completely the biocompatibility properties of Religa Heart EXT structural polymers, the inflammatory and allergic reaction in vivo tests as well as in vivo toxicity tests will be carried out.



RYS. 4. Porównanie sygnałów IR poliuretanów a) przed i po przetwórstwie (b).

FIG. 4. Comparison of polyurethane IR signals a) before and b) after technological processing.