

kopolimer glikolidu i *L,L*-laktidu. Z matrycy zawierającej doksorubicynę lek uwalnia się bardzo wolno w pierwszych dniach eksperymentu z powolnym narastaniem do 90 dnia. Od tego dnia obserwowana jest zwiększona degradacja matrycy. Z matrycy zawierającej idarubicynę, 80% leku uwalnia się równomiernie w ciągu 40 dni. Po tym czasie ze względu na wyczerpanie się większej ilości leku znajdującego się w matrycy, jego szybkość uwalniania maleje.

Wnioski

Stwierdzono istotną różnicę w profilu uwalniania doksorubicyny z matrycy zawierającej kopolimer glikolidu i *L,L*-laktidu w stosunku do profilu idarubicyny. Widma IR potwierdziły jednoznacznie obecność międzycząsteczkowych wiązań wodorowych między grupą hydroksylową doksorubicyny i grupą karbonylową polilaktidu. Ten rodzaj oddziaływań ma istotny wpływ na kinetykę uwalniania badanych antrycyklin.

Podziękowania

Badania były finansowane przez Fundację Rozwoju Nauk Farmaceutycznych, nr grantu (3/FB/2004) oraz Fundację na Rzecz Wspierania Rozwoju Polskiej Farmacji i Medycyny, nr grantu (II/206/2003).

Piśmiennictwo

- [1] A. Czajkowska, M. Bero, Dobrzyński P., J. Kasperczyk. „Badanie biogodności kopolimerów glikolidu i laktidu otrzymywanych z wykorzystaniem nowego inicjatora cyrkonowego lub cynowego w oparciu o badania in vitro”, *Inżynieria Biomateriałów*, (2001), 17
- [2] J. Kasperczyk, K. Stokłosa, K. Trzepletowska-Stępień, A. Wilczok, P. Dobrzyński, M. Bero, M. Sokół, W. Przybyszewski, M. Jurkowski: „Zastosowanie bioresorbowalnych materiałów polimerowych o modelowanej strukturze do kontrolowanego uwalniania antrycyklin w terapii glejaka mózgu”, *Chemik*, 2, (2006), 95-102

POLISILOKSANOWE POWŁOKI IMPLANTÓW MEDYCZNYCH. WPŁYW PLAZMY FLUOROWEJ NA SKŁAD CHEMICZNY I WŁAŚCIWOŚCI POLISILOKSANU

DARIUSZ SZMIGIEL*, KRZYSZTOF DOMAŃSKI*, PIOTR PROKARYN*, PIOTR GRABIEC*, ELŻBIETA PAMUŁA**, ANNA ŚCISŁOWSKA-CZARNECKA***, BARBARA PŁYTYCZ****

*INSTYTUT TECHNOLOGII ELEKTRONOWEJ,
AL. LOTNIKÓW 32/46, 02-668 WARSZAWA

**AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA,
WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI,
AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW

***AKADEMIA WYCHOWANIA FIZYCZNEGO, WYDZIAŁ ANATOMII,
AL. JANA PAWŁA II 78, 31-571 KRAKÓW

****UNIwersytet Jagielloński, Instytut Zoologii, Katedra Immunologii Ewolucyjnej, ul. Ingardena 6, 30-060 Kraków
E-MAIL: DAREK@CH.PW.EDU.PL

Słowa kluczowe: elastomer, polisiloksan, powłoki implantów medycznych, trawienie plazmowe, właściwości powierzchni
[*Inżynieria Biomateriałów*, 58-60,(2006),206-209]

about 100 days. Influence of interaction of hydroxyl group of doxorubicin on amount of release drug is visible in comparison to release profile of idarubicin from matrix containing copolymer of glycolide and *L,L*-lactide. From matrix containing doxorubicin drug is released very slowly at first days of experiment with slowly accretion until ninetieth day. Until this day increase of matrix degradation is observed. From matrix containing idarubicin, 80% of drug is released evenly through 40 days. After this time because of exhaustion of major amount of drug velocity of release is decreasing.

Conclusions

Differences of doxorubicin release profiles from matrix containing glycolide and *L,L*-lactide copolymer in comparison to idarubicin release profiles were noticed. IR spectra explicitly presence of intermolecular hydrogen bonds between hydroxyl group of doxorubicin and carbonyl group of polylactide were confirmed. This kind of interactions have essential influence for kinetics of investigated anthracyclines release.

Acknowledgements

This study was supported by Foundation of Pharmaceutical Sciences Development, grant (No 3/FB/2004) and Foundation for Polish Pharmacy and Medicine Development Support, grant (No II/206/2003)

References

- [3] H. Brem, P. Gabikian. "Biodegradable polymer implants to treat brain tumors", *Journal of Controlled Release*, 74, (2001), 63-67
- [4] P. Dobrzyński, J. Kasperczyk, H. Janeczek, M. Bero: "Synthesis of biodegradable copolymers with the use of low toxic zirconium compounds. 1. Copolymerization of glycolide with L-lactide initiated by $Zr(acac)_4$ ", *Macromolecules*, 34, (2001), 5090-5098

PLASMA TREATED POLYSILOXANE COATING FOR MEDICAL IMPLANTS

DARIUSZ SZMIGIEL*, KRZYSZTOF DOMAŃSKI*, PIOTR PROKARYN*, PIOTR GRABIEC*, ELŻBIETA PAMUŁA**, ANNA ŚCISŁOWSKA-CZARNECKA***, BARBARA PŁYTYCZ****

*INSTITUTE OF ELECTRON TECHNOLOGY,
AL. LOTNIKÓW 32/46, 02-668 WARSZAW, POLAND

**AGH-UST, FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS,
AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKOW, POLAND

***ACADEMY OF PHYSICAL EDUCATION, FACULTY OF ANATOMY,
AL. JANA PAWŁA II 78, 31-571 KRAKOW, POLAND

****JAGIELLONIAN UNIVERSITY, INSTITUTE OF ZOOLOGY,
DEPARTMENT OF EVOLUTIONARY IMMUNOBIOLOGY
UL. INGARDENA 6, 30-060 KRAKOW, POLAND
E-MAIL: DAREK@CH.PW.EDU.PL

Key words: silicone elastomer, polysiloxane, coating for medical implants, plasma etching, surface properties

[*Engineering of Biomaterials*, 58-60,(2006),206-209]

Dynamiczny rozwój mikrotechnologii umożliwia wytwarzanie coraz bardziej zaawansowanych miniaturowych przyrządów biomedycznych, np. niewielkich implantów. Układy mikroelektroniczne oraz mikromechaniczne stosowane w implantach muszą być pokryte szczelną powłoką dobrze tolerowaną przez żywy organizm. W grupie materiałów znajdujących zastosowanie jako powłoki implantów znajdują się m.in. polisiloksany. Zaletą tych materiałów jest ich relatywnie niska cena oraz biogodność. Jednakże trzeba brać pod uwagę, że różne etapy procesu technologicznego, np. trawienie plazmowe mogą wpływać na zmianę składu chemicznego oraz właściwości powłok polimerowych. Zmiany te mogłyby być przyczyną wystąpienia wadliwego działania implantu oraz różnych dolegliwości u pacjenta. Prezentowane wyniki dotyczą wpływu plazmy fluorowej na skład chemiczny oraz właściwości powierzchni wyjściowo biogodnego elastomeru.

Metodyka badań

Badanym materiałem był elastomer (MED-6215), wytwarzany przez firmę Silicone Technology, będący kopolimerem polimetylosiloksanu z polidimetylosiloksanem. Dwa ciekłe komponenty elastomeru zostały zmieszane w stosunku 10:1 i odpowietrzone w eksyktorze. Następnie ciekły prekursor polimeru został wylany do specjalnie przygotowanych form z tworzywa sztucznego i wysuszony w temperaturze ok. 100°C. Otrzymane w ten sposób okrągłe kawałki folii o średnicy 3,8" i grubości 2 mm zostały usunięte z form i umieszczone na powierzchni 4" płytek krzemowych. Na powierzchni polimeru osadzono ~ 1 µm warstwę aluminium (maska dla trawienia plazmowego) i zdefiniowano wzór testowy metodą fotolitografii. Z wybranych obszarów próbek usunięto aluminium metodą mokrego trawienia w mieszaninie kwasów fosforowego, azotowego oraz octowego. Eksperymenty trawienia plazmowego wykonano przy użyciu reaktora typu RIE (Reactive Ion Etching – Reaktywne Trawienie Jonowe) – Plasmalab µP80. Warstwy polisiloksanu trawiono w plazmie fluorowej (SF₆ or CF₄) zawierającej ok. 20% tlenu. Plazma o takim składzie pozwala na uzyskanie najwyższej szybkości (~ 1 µm/min) trawienia polisiloksanu [1]. Bezpośrednio po zabiegu trawienia plazmowego próbki były zanurzane w mieszaninie kwasów (fosforowego, azotowego i octowego) w celu usunięcia maski aluminiowej. Zmiany morfologii polisiloksanu poddanego działaniu plazmy weryfikowano przy użyciu skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM). Pomiar kąta zwilżania powierzchni polimeru przed i po trawieniu plazmowym wykonano stosując analizator kształtu kropli DSA-Mk2 firmy Kruss. Analizę składu warstwy przypowierzchniowej polimeru o grubości rzędu kilku nanometrów przeprowadzono metodą spektroskopii fotoelektronów wybijanych promieniowaniem rentgenowskim używając analizatora VG Microlab 350. W celu zweryfikowania przydatności polisiloksanu poddanego działaniu plazmy fluorowej dla celów biomedycznych przeprowadzono badania cytotoxyczności. Do badań komórkowych, materiały polimerowe wyjąłwiono w autoklawie parowym i umieszczono w 24-dołkowej płytce hodowlanej (Nunc, Dania). Zawiesinę fibroblastów L929 w medium hodowlanym RPMI 1640 (Sigma, Niemcy) zawierającym 10% cielęcej surowicy płodowej (ICN, Niemcy) i antybiotyki (100 UI/ml penicyliny, 10 mg/ml streptomycyny i 25 µg/ml amfoterycyny, Sigma, Niemcy) osadzono na każdej próbce i na szkiełkach nakrywkowych stanowiących kontrolę (gęstość komórek 3x10⁴ komórek/ml). Komórki hodowano przez 3 dni w inkubatorze (Nuair, USA) w temperaturze

Modern microfabrication methods allow producing increasingly advanced BioMEMS (Biomicroelectromechanical systems) devices e.g. various medical implants. Such devices need special coating in order to be safely implanted into a living body and remain there for many years. One of the materials considered as a proper coating is a silicone elastomer. The advantages of this material are its relatively low price and biocompatibility. Plasma treatment and other technological operations, however, can impart a range of physical and/or mechanical properties of polymer coating and can also induce specific biological responses when a device is placed in a body. This paper describes the effect of fluorine-based plasma treatment on surface properties of an initially biocompatible silicone elastomer.

Materials and methods

The investigated coating material was poly(methylhydrogensiloxane-co-dimethylsiloxane) elastomer, which is chemically similar to a widely known PDMS. The samples were prepared using commercially available silicone elastomer (MED-6215) made by Silicone Technology. Two liquid components of MED-6215 were mixed in the 10:1 ratio and subsequently the mixture was de-aired in a desiccator. The liquid precursor was cast into the special plastic molds and then dried. Subsequently, flexible circular foil pieces (~ 2 mm thick and 3.8" in diameter) were removed from the molds and placed onto the standard 4" silicone wafers. The polymer surface was sputter-deposited with aluminium (~ 1 µm) and patterned using conventional photolithography. The etching windows were formed by removing aluminium with a mixture of phosphoric, nitric and acetic acids.

The etching experiments were carried out in a Plasmalab µP80 reactive ion etcher. The polysiloxane layers were etched using fluorine based plasma (SF₆ or CF₄) containing ca 20% of oxygen. Such chemistry leads to the highest etch rate (~ 1 µm/min) of the polysiloxane [1]. Directly after the plasma treatment the samples were immersed in the acid mixture to remove the aluminium mask. The morphology of the polymer etched surface was examined using a scanning electron microscope (SEM). Prior to SEM inspection a thin chromium or gold layer was deposited in order to avoid strong surface charging. Static water contact angles of the surfaces before and after plasma treatment were measured in an atmospheric environment using an automatic contact angle goniometer (Kruss, Drop Shape Analysis System DSA10-Mk2). The X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) analysis was done in a VG Microlab 350 with an analyzing depth of several nm.

Cytotoxicity tests have been initiated in order to verify the usefulness of the plasma treated coatings in biomedical applications. For cell culture studies, the materials were steam-sterilized and placed into the 24-well culture dishes (Nunc, Denmark). A suspension of L929 fibroblasts in RPMI 1640 (Sigma, Germany) containing 10% foetal bovine serum (ICN, Germany), and antibiotics (100 UI/ml penicillin, 10 mg/ml streptomycin and 25 µg/ml amphotericin, Sigma, Germany) was seeded on each sample and on control glass coverslips (cell density 3x10⁴ cells/ml). The cells were cultured at 37°C in an incubator (Nuair, USA) with humidified 5% CO₂ atmosphere for 3 days. The adhesion of cells was measured by crystal violet test (CV). The foils were rinsed with saline (PBS), fixed in 2% formalin (POCH, Gliwice, Poland) for 1h at 21°C and stained with 0.5 ml of crystal violet (0.5% in 20% methanol) for 5 min. After washing with water the materials were transferred to new

37°C w atmosferze zawierającej 5% CO₂. Adhezję komórek badano za pomocą testu wchłaniania fioletu krystalicznego (CV). Po przepłukaniu próbek w PBS, zaadherowane komórki utrwalono w 2% formalinie (POCH, Gliwice) przez 1h w 21°C i wybarwiono przez 5 min w 0.5 ml fioletu krystalicznego (0.5% w 20% metanolu). Po przepłukaniu wodą, próbki przeniesiono do nowej 24-dółkowej płytki hodowlanej i wyekstrahowano zaabsorbowany barwnik w 1 ml 100% metanolu (POCH, Gliwice). Następnie mierzono gęstość optyczną (OD) dla długości fali 570 nm za pomocą spektrofotometru Export Plus (Asys Hitach, Austria). Żywotność komórek określono za pomocą testu MTT. Do każdego dołka dodano 100 µl wodnego roztworu MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Sigma, Niemcy) o stężeniu 5mg/ml. Po 1-godzinnej inkubacji w ciemności w 37°C reakcję zatrzymano poprzez dodanie 1 ml izopropanolu zawierającego 3% HCl (POCH, Gliwice). Płytkę wytrząsano na wytrząsarce (Elpan, Poland) przez 30 min. Następnie mierzono gęstość optyczną (OD) dla długości fali 570 nm za pomocą spektrofotometru Export Plus (Asys Hitach, Austria).

Wyniki i dyskusja

Na RYS.1a, b i c przedstawiono morfologię polisiloksanu przed i po zabiegu trawienia plazmowego w plazmie CF₄+O₂ lub SF₆+O₂. Stwierdzono, że obie stosowane plazmy fluoro-we wpływają istotnie na morfologię polimeru. Powierzchnia próbki trawionej w plazmie SF₆+O₂ (rys. 1b) charakteryzuje się zwartą morfologią, niemniej zmienioną istotnie w porównaniu do wyjściowej (RYS.1a). Z kolei na powierzchni polimeru eksponowanego na działanie plazmy CF₄+O₂ stwierdzono obecność nieregularnych struktur (RYS.1c).

Badania zwilżalności powierzchni wskazują, że powierzchnia polisiloksanu (przed trawieniem plazmowym) jest bardzo jednorodna i hydrofobowa (wartości kąta zwilżania >100°). W przypadku próbek poddanych działaniu plazmy stwierdzono mniejszą jednorodność powierzchni oraz nieco niższe wartości kąta zwilżania. Co więcej, krople kładzione na powierzchni poddanej działaniu plazmy miały asymetryczny kształt. Mimo opisanych powyżej zmian wywołanych działaniem plazmy stwierdzono, że polimer zachowuje hydrofobowe własności powierzchni.

Badania profilu wglębnego metodą XPS wskazują, że zmiana składu chemicznego polisiloksanu wywołana plazmą fluorową zachodzi wyłącznie w obszarze przypowierzchniowym polimeru. Na powierzchni badanych próbek stwierdzono obecność warstwy zawierającej do 10% fluoru. Stwierdzono również, że stężenie fluoru spada do zera na głębokości kilku nanometrów. Oznacza to, że fluor nie dyfunduje do wnętrza warstwy, ale pozostaje wyłącznie w warstwie przypowierzchniowej polimeru.

Na RYS.2 przedstawiono wyniki testu wchłaniania fioletu krystalicznego i testu MTT. Badanie wchłaniania fioletu krystalicznego jest metodą oceniającą zdolność przylegania komórek do powierzchni [2], podczas gdy żywotność komórek określa się na podstawie aktywności dehydrogenaz mitochondrialnych [3]. Badania wykazały, że adhezja komórek do badanych materiałów jest statystycznie niższa niż do materiału kontrolnego (szkło). Zastosowana modyfikacja plazmą poprawia znacznie przyleganie komórek do podłoża w porównaniu z niemodyfikowanym materiałem polisiloksanowym. Żywotność komórek na wszystkich badanych materiałach jest bardzo wysoka i porównywalna z kontrolą.

24-well dishes and absorbed stain was extracted in 1 ml of 100% methanol (POCH, Gliwice, Poland). Finally, the optical density (OD) was measured at 570 nm with Expert Plus spectrophotometer (Asys Hitach, Austria). The viability of cells was estimated by MTT assay method. For each wells 100 µl of 5mg/ml MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Sigma, Germany) water solution was added. After 1 h incubation in the dark at 37°C the reaction was stopped by pouring 1 ml of isopropanol containing 3% HCl (POCH, Gliwice, Poland) and the dish was put on a shaker (Elpan, Poland) for 30 min. Finally, the optical density (OD) of formazan in the solution was measured at 570 nm with an Expert Plus spectrophotometer (Asys Hitach, Austria).

Results and discussion

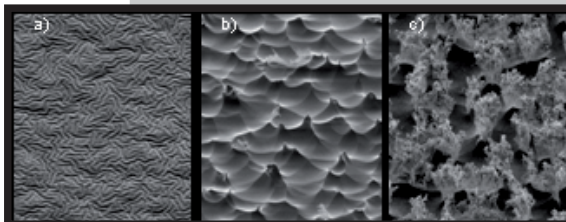
FIGs.1 a, b, c show the morphology of the polysiloxane prior to and after etching in CF₄+O₂ or SF₆+O₂ plasma. It was found that both fluorine-based plasmas strongly affect the initial morphology of the polysiloxane. The surface exposed to SF₆+O₂ plasma exhibits specific post-etch morphology, while the surface etched with CF₄+O₂ plasma is additionally covered with 3d irregular features.

The contact angle measurements show that the raw polysiloxane surface has highly homogenous and hydrophobic characteristic (water contact angles above 100°). Both fluorine-based plasma treatments make the polymer surface less uniform and lead to a decrease in initial contact angle. The contact angle values after the etching are scattered significantly. Furthermore, an asymmetric drop shape is observed in the case of both plasma exposed surfaces. Nevertheless, one may say that the polysiloxane surface preserves its hydrophobic properties after the plasma processing. At the present stage of technology development the SF₆+O₂ plasma treatment appears more promising than CF₄+O₂ one due to better surface uniformity and higher etching rate [1].

The XPS depth profile through successive layers indicates that samples modification under plasma conditions is limited just to the surface layer. The formation of a top layer rich in plasma originated fluorine was detected. It was also found that fluorine concentration drops to zero at the depth of a few nanometers. This indicates that fluorine does not diffuse through the bulk but remains at the surface and in the near-surface region.

FIG.2 presents the result of crystal violet and MTT tests. Crystal violet is a method to evaluate cell adhesion to biomaterial surface [Plytycz et al., 1992], while MTT asses viability of cells by measurement of activity of mitochondrial dehydrogenases [Berg et al., 1990]. The results show that the adhesion of cells to studied materials is considerably lower

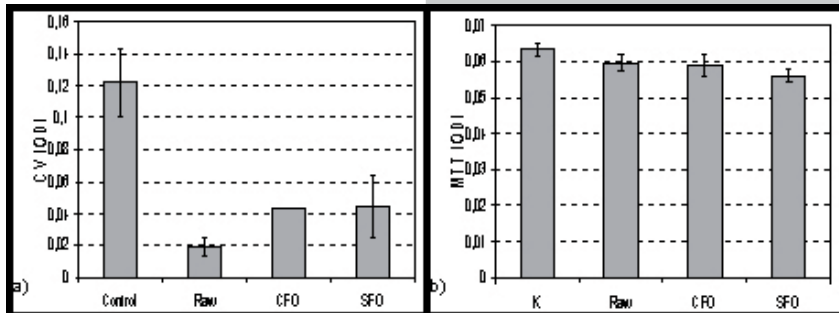
than to control glass. Applied modification significantly improves adhesion of cells in comparison to raw polysiloxane material. Viability of cells on polysiloxane materials is very high and comparable to control.



RYS.1. Powierzchnia polisiloksanu przed (a), po trawieniu plazmowym w plazmie SF₆+O₂ (b) i CF₄+O₂ (c) zobrazowana przy pomocy SEM.
 FIG.1. SEM pictures of polysiloxane prior to (a), after CF₄+O₂ (b) and SF₆+O₂ (c) plasma treatment.

Podziękowania

Praca została częściowo sfinansowana przez Komisję Europejską w ramach projektu Healthy Aims IST-2002-1-001837



RYS.2. Adhezja komórek (fibroblastów L929) oznaczona przez wchłanianie fioletu krystalicznego (a) oraz żywotność komórek określona za pomocą testu MTT (b) hodowanych na materiale kontrolnym (Control), polisiloksanie przed (Raw), po trawieniu w plazmie CF_4+O_2 (CFO) i SF_6+O_2 (SFO); O.D. – gęstość optyczna.

FIG.2. Adhesion by crystal violet (a) and viability by MTT tests (b) of L929 fibroblasts grown on control glass, polysiloxane prior (Raw), and after CF_4+O_2 (CFO) and SF_6+O_2 plasma (SFO); O.D. – optical density.

Acknowledgements

This work has been partially supported by the European Commission within the Healthy Aims Project IST-2002-1-001837.

Piśmiennictwo

- [1] Szmigiel D, Domanski K, Prokaryn P, Grabiec P. 2006: Deep etching of biocompatible silicone rubber, *Microelectron. Eng.* 83: 1178-1181
- [2] Plytycz B, Rozanowska M, Seljelid R. 1992: Quantification of neutral red pinocytosis by small numbers of adherent cells: comparative studies. *Folia Biol (Krakow)*. 40: 3-9.

References

- [3] Berg K, Hansen MB, Nielsen SE. 1990: A new sensitive bioassay for precise quantification of interferon activity as measured via the mitochondrial dehydrogenase function in cells (MTT-method). *APMIS*. 98: 156-62.

CHARAKTERYSTYKA BIOMECHANICZNA STENTU WIEŃCOWEGO Z TECHNOLOGIĄ OCC

W. WALKE*, Z. PASZENDA*, W. JURKIEWICZ**

*INSTYTUT MATERIAŁÓW INŻYNIERSKICH I BIOMEDYCZNYCH, POLITECHNIKA ŚLĄSKA

UL. KONARSKIEGO 18A, 44-100 GLIWICE, POLSKA

**DRG MEDTEK,

UL. WITA STWOSZA 24, 02-661 WARSZAWA, POLSKA

E-MAIL ADRES: WITOLD.WALKE@POLSL.PL

[*Inżynieria Biomateriałów, 58-60,(2006),209-211*]

Wprowadzenie

Z uwagi na fakt, iż nie mamy możliwości badania wzajemnego oddziaływania stentów i naczyń krwionośnych w badaniach in vivo coraz więcej miejsca w literaturze poświęca się badaniom modelowym z wykorzystaniem metody elementów skończonych [1-9]. Dysponując trójwymiarowym modelem zaimplantowanego stentu do naczynia krwionośnego oraz jego parametrami mechanicznymi jesteśmy w stanie oszacować wzajemne relacje pomiędzy tymi obiektami. Prowadzone analizy dotyczą najczęściej rozkładu naprężeń i przemieszczeń poszczególnych elementów zamodelowanego układu oraz problematyki przepływu krwi. Tego rodzaju badania poddawane są również weryfikacji doświadczalnej, która

BIOMECHANICAL CHARACTERISTIC OF CORONARY STENT DESIGN WITH OFFSET CROWN CONNECTION TECHNOLOGY

W. WALKE*, Z. PASZENDA*, W. JURKIEWICZ**

*INSTITUTE OF ENGINEERING MATERIALS AND BIOMATERIALS, SILESIAN UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,

UL. KONARSKIEGO 18A, 44-100 GLIWICE, POLAND

**DRG MEDTEK,

UL. WITA STWOSZA 24, 02-661 WARSZAWA, POLAND

E-MAIL ADDRESS: WITOLD.WALKE@POLSL.PL

[*Engineering of Biomaterials, 58-60,(2006),209-211*]

Introduction

As there is no possibility to investigate the interaction of stents and coronary vessels in vivo, more and more publications are dedicated to model research using the finite elements method [1-9]. Having the 3D model of stent implanted into the coronary vessel with its mechanical parameters we are able to evaluate interaction of these structures. Analyses carried out refer most often to distributions of stresses and strains of the particular elements of the modeled system and to blood flow problem. The research results are also verified in practice, which makes it possible to develop the approximation of the physiologic conditions of the environ-