

BADANIA HEMOZGODNOŚCI WARSTW PASYWNO- WĘGLOWYCH STOSOWANYCH DO USZLACHETNIENIA POWIERZCHNI STENTÓW WIEŃCOWYCH

ZBIGNIEW PASZENDA*, BARBARA DUDA**, PIOTR WILCZEK***

* INSTYTUT MATERIAŁÓW INŻYNIERSKICH I BIOMEDYCZNYCH,
POLITECHNIKA ŚLĄSKA

UL. KONARSKIEGO 18A, 44-100 GLIWICE

** LABORATORIUM BIOZGODNOŚCI, PRACOWNIA SZTUCZNEGO
SERCA, FUNDACJA ROZWOJU KARDIOCHIRURGII,
41-800 ZABRZE UL. WOLNOŚCI 345A

*** LABORATORIUM HODOWLI TKANEK I CYTOMETRII PRZEPŁYWO-
WEJ, FUNDACJA ROZWOJU KARDIOCHIRURGII,
41-800 ZABRZE UL. WOLNOŚCI 345A

Streszczenie

Prezentowana praca dotyczy problematyki uszlachetniania powierzchni implantów stosowanych w kardiologii zabiegowej. Zasadniczym jej celem była ocena biotolerancji w środowisku krwi warstw pasywnej i pasywno-węglowej wytworzonych na powierzchni implantów. Zgodnie z zaleceniami norm dla implantów będących w kontakcie z krwią ponad 30 dni zrealizowano badania dotyczące cytotoxyczności (na ekstraktach i w kontakcie bezpośrednim) oraz badania hemolizy i wykrzepiania. Uzyskane w pracy wyniki wskazują, że biotolerancja warstw pasywnej oraz pasywno-węglowej oceniana na podstawie obowiązujących standardów w badaniach *in vitro* jest dobra.

Słowa kluczowe: biomateriały metalowe, stale Cr-Ni-Mo, stenty wieńcowe, kardiologia zabiegowa, trombogenność, hemozgodność

Wprowadzenie

W ostatnim okresie w literaturze pojawiły się doniesienia o korzystnym wpływie warstw węglowych na biotolerancję implantów z biomateriałów metalicznych. Tej problematyce poświęcone były także wieloletnie badania interdyscyplinarne prowadzone w Politechnice Śląskiej pod kierunkiem prof. J. Marciniaka we współpracy z zespołem prof. S. Mitury z Politechniki Łódzkiej w Łodzi. Badania skoncentrowane były na opracowaniu techniki wytwarzania warstwy diamentowej na podłożu stali Cr-Ni-Mo, stopów kobaltowych i tytanowych [1-4].

Początkowo, badania skupiono na zagadnieniach wytwarzania warstwy pasywno-diaamentowej na powierzchni implantów ze stali AISI 316L. Stal ta powszechnie stosowana jest do wytwarzania różnych postaci użytkowych implantów dla chirurgii urazowo-ortopedycznej, szczególnie-

INVESTIGATION OF HAEMOCOMPATIBILITY OF THE PASSIVE- CARBON COATINGS USED FOR IMPROVEMENT OF THE CORONARY STENTS' SURFACES

ZBIGNIEW PASZENDA*, BARBARA DUDA**, PIOTR WILCZEK***

* INSTITUTE OF ENGINEERING MATERIALS AND BIOMATERIALS,
SILESIA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,
UL. KONARSKIEGO 18A, 44-100 GLIWICE, POLAND

** ARTIFICIAL HEART LABORATORY, FOUNDATION OF CARDIAC
SURGERY DEVELOPMENT, 41-800 ZABRZE UL. WOLNOŚCI 345A,
POLAND

*** CELL CULTURE AND FLOW CYTOMETRY LABORATORY, FOUNDATION
OF CARDIAC SURGERY DEVELOPMENT, 41-800 ZABRZE UL.
WOLNOŚCI 345A, POLAND

Abstract

Presented work refers to the problem of improvement of the surfaces of stents used in the operative cardiology. Its main goal has been assessment of the biotolerance in the blood environment of the passive and passive-carbon coatings, developed on the implants' surfaces. According to recommendations of standards for implants interacting with blood for more than 30 days, investigations were carried out of the cytotoxicity (using extracts and in the direct contact), as well as of haemolysis and coagulation. Research results collected suggest that the biotolerance of the passive and passive-carbon coatings evaluated basing on the standards binding in the *in vitro* tests is good.

Key words: metal biomaterials, Cr-Ni-Mo steels, coronary stents, interventional cardiology, thrombogenicity, haemocompatibility

Introduction

Reports appeared recently in the literature on the advantageous effect of carbon coatings on biotolerance of implants made from the metallic biomaterials. Many years long interdisciplinary research carried out at the Silesian University of Technology, guided by prof. J. Marciniak in co-operation with the group of prof. S. Mitura from the Technical University of Łódź has been also dedicated to these problems. The research was focused on working out a technique of developing the diamond coating on substrates like the Cr-Ni-Mo steel, cobalt and titanium alloys [1-4].

The research was focused first on the problem of developing the passive-diamond coating on the surfaces of implants made from the AISI 316L steel. This steel is commonly used for manufacturing various types of implants for

twarzowej i kardiologii zabiegowej. Na podstawie przeprowadzonych badań ustalono warunki techniki wytwarzania powłoki kompozytowej o optymalnych właściwościach fizykochemicznych. Wyniki badań wykonanych w warunkach *in vitro* wskazały, że powłoka ta gwarantuje implantom bardzo dobrą odporność na korozję wżerową, szczelinową i naprężeniową. Ponadto w badaniach przeprowadzonych w tkankach zwierząt doświadczalnych wykazano bardzo dobrą ich biotolerancję. Wprowadzone do środowiska tkanekowego implanty nie wywołały zmian patogennych w otaczających tkankach (podskórnej tkance tłuszczowej, mięśniowej i kostnej) oraz nie wywarły wpływu toksycznego na narządy mięsiste (wątrobę, nerki, śledzionę i płuca) [5÷10].

Pozytywne wyniki badań przeprowadzone w warunkach *in vitro* oraz *in vivo* skłoniły autorów do podjęcia badań przydatności warstwy pasywno-węglowej dla implantów stosowanych w kardiologii zabiegowej [11,12]. Badania realizowane są we współpracy ze Śląskim Centrum Chorób Serca w Zabrzu. Z uwagi na specyficzną postać stentów wieńcowych, ich cechy geometryczne oraz stosowaną technikę implantacji (wysokociśnieniowa metoda rozprężania) wystąpiła konieczność opracowania nowych warunków wytwarzania warstwy dla tego rodzaju implantów, a także uwzględnienia specyficznych metod badań własności fizykochemicznych.

Modyfikacja powierzchni stentów z zastosowaniem warstw pasywnej oraz pasywno-węglowej wymaga przeprowadzenia badań biotolerancji w środowisku krwi. Wyboru badań dokonuje się w oparciu o określone kryteria zawarte w normie PN-ISO 10993-1 [13]. Norma ta wyszczególnia ogólne zalecenia dotyczące wyboru badań z uwzględnieniem klasyfikacji wyrobów medycznych.

W przypadku podejmowania decyzji o przystąpieniu do oceny biologicznej nowego wyrobu w projektowaniu badań i testów należy wziąć pod uwagę przede wszystkim rzeczywiste, proponowane zastosowanie nowego wyrobu z uwzględnieniem rodzaju kontaktu z organizmem człowieka i czasu jego trwania. Dlatego też przytoczona norma określa między innymi jakie badania we wstępnej ocenie biologicznej powinny być wzięte pod uwagę dla wyrobów implantowanych będących w kontakcie z krwią - TABELA 1.

traumatic and orthopaedic surgery, maxillofacial surgery, and for the interventional cardiology. Basing on the research results the conditions were determined for developing the composite coating with the optimum physical and chemical properties. Results of the *in vitro* tests have revealed that this coating guarantees the implants a very good pitting, crevice, and stress corrosion resistance. Moreover, their very good biotolerance has been demonstrated in tests carried out in tissues of the experimental animals. The implants introduced into the tissue environment did not evoke any pathogenic lesions in the surrounding tissues (subcutaneous fatty tissue, muscular, nor osseous tissues), and did not exert a toxic influence on the parenchymatous organs (liver, kidneys, spleen, and lungs) [5÷10].

The positive results of the *in vitro* and *in vivo* tests have induced the authors to commence the investigation of applicability of the passive-carbon coating for implants used in the operative cardiology [11,12]. The research is carried out in co-operation with the Silesian Centre for Cardiac Diseases in Zabrze. The need has arisen for working out of the new conditions of developing this coating for such implants, and taking into consideration the specific methods of testing of their physical and chemical properties, because of the specific geometrical features of the coronary stents and the implantation technique used (high-pressure expansion).

Modification of the surface of stents using the passive and passive-carbon coatings calls for biotolerance tests in the blood environment. Selection of tests is carried out basing on the criteria specified in the PN-ISO 10993-1 standard [13]. This standard specifies the general recommendations for selection of tests taking into consideration the classification of medical products.

In case of taking a decision about going in for the biological assessment of a new product when designing the experiments and tests one has to take into account, first of all, the real, proposed application of the new product, giving consideration to the type of its contact with the human body and its duration. Therefore, the cited standard specifies, among others, what tests should be taken into account in the initial biological assessment for the implanted products remaining in contact with blood - TABLE 1.

Klasyfikacja wyrobów medycznych ze względu na: Classification of medical products based on:		Działanie biologiczne Biological activity								
Rodzaj kontaktu z organizmem Type of the contact with the body		Czas trwania kontaktu: A – ograniczony (? 24 h) B – przedłużony (24 h do 30 dni) C – stały (powyżej 30 dni) Duration of contact: A – limited (? 24 h) B – extended (24 h to 30 days) C – permanent (more than 30 days)	Cytotoksyczność Cytotoxicity	Działanie uczulające Allergenic	Działanie drażniące lub reaktywność skórna Irritating or intracutaneous reactivity	Toksyczność ogólnoustrojowa (ostra) Systemic toxicity (acute)	Toksyczność subchroniczna (podostra) Subchronic toxicity (subacute)	Genotoksyczność Genotoxicity	Implantacja Implantation	Zgodność z krwią Haemocompatibility
Kategoria Category	Kontakt Contact									
Wyroby implantowane Implanted products	Krew Blood	A	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
		B	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
		C	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

TABELA 1. Zalecenia dotyczące wyboru badań we wstępnej ocenie biologicznej [13,14]

TABLE 1. Recommendations for selection of tests for the initial biological assessment [13,14]

Interakcja biomateriałów z krwią jest procesem wciąż nie do końca poznany. We krwi w obecności biomateriału nie powinny następować zmiany w postaci [15]:

- nieodwracalnych uszkodzeń budowy białek,
- blokowania działania enzymów,
- zmian składu elektrolitów,
- uszkodzeń i uwalniania zawartości składników upostaciowionych krwi,
- wykrzepiania krwi.

Biomateriały krwiozgodne nie powinny również powodować w otaczających je tkankach reakcji toksycznych, immunologicznych lub mutagennych.

Po wielu latach poszukiwań biomateriałów krwiozgodnych, nadal nie można się spodziewać, aby kontakt biomateriału z krwią nie powodował - w mniejszym lub większym stopniu - zmian we krwi. Do oceny tych zmian zaproponowano dotychczas bardzo wiele metod postępowania badawczego, z których tylko nieliczne zostały opracowane w postaci aktów normatywnych.

Material do badań

W pracy przeprowadzono badania biotolerancji z krwią warstw pasywnej i pasywno-węglowej przeznaczonych do uszlachetniania powierzchni stentów wieńcowych o postaci zaproponowanej przez zespół prof. L. Polońskiego ze Śląskiego Centrum Chorób Serca w Zabrzu i wytworzonych z austenitycznej stali Cr-Ni-Mo [16÷18]. Dla implantów będących w kontakcie ze środowiskiem krwi ponad 30 dni wymagane jest przeprowadzenie między innymi badań dotyczących ich cytotoksyczności oraz zgodności z krwią - TABEŁA 1. W szczególności w pracy przeprowadzono:

- badania cytotoksyczności na ekstraktach,
- badania cytotoksyczności w kontakcie bezpośrednim,
- test hemolizy w bezpośrednim kontakcie i z ekstraktu,
- test krzepnięcia krwi.

Z uwagi na zalecenia normatywne, badania przeprowadzono na próbkach litych wykonanych ze stali Cr-Ni-Mo. Dla poszczególnych pomiarów przygotowano próbki w postaci:

- prostopadłościanu o wymiarach 50x10 x6 mm (wymagana minimalna wartość powierzchni jednej ze ścian poddanych badaniom 50x3 mm) - badania cytotoksyczności w kontakcie bezpośrednim,
- walca o średnicy $d = 10$ mm i wysokości $h = 8$ mm (wymagana minimalna masa próbki 4 g) - badania cytotoksyczności w kontakcie pośrednim (z ekstraktem),
- walca o średnicy $d = 10$ mm i wysokości $h = 30$ mm (wymagana minimalna masa próbki 15 g) - test hemolizy,
- w walca o średnicy $d = 10$ mm i wysokości $h = 25$ mm (wymagana minimalna powierzchnia całkowita próbki 8 cm²) - test krzepnięcia.

Badaniom poddano próbki o powierzchni polerowanej elektrolitycznie i spasywowanej oraz polerowanej elektrolitycznie, spasywowanej z naniesioną warstwą węglową. Obróbkę elektrochemiczną (polerowanie) i chemiczną (pasywacja) przeprowadzono w warunkach opracowanych przez zespół prof. J. Marciniaka z Politechniki Śląskiej w Gliwicach. Proces nanoszenia warstwy węglowej metodą rf PACVD realizowano w Instytucie Inżynierii Materiałowej Politechniki Łódzkiej w Łodzi.

Metodyka badań

Badania cytotoksyczności

Badania cytotoksyczności przeprowadzono w Laboratorium Hodowli Tkanek i Cytometrii Przepływowej Funda

Interaction of biomaterials with blood is a process still not fully understood. In the presence of biomaterial, in blood should not occur changes like [15]:

- irreversible damages of structure of proteins,
- blocking of activity of enzymes,
- changes of composition of electrolytes,
- damages and releasing of the blood cells' contents,
- blood coagulation.

The haemocompatible biomaterials should neither cause the toxic, immunological, nor mutagenic reactions in the surrounding tissues.

One still cannot expect, after many years of search for the haemocompatible biomaterials, that the contact of the biomaterial with blood would not cause - to a certain degree - changes in blood. Numerous research procedures were proposed for evaluation of these changes, however, only a few were worked out as norm setting acts.

Material for investigation

The research work included tests of the biotolerance with blood of the passive and passive-carbon coatings used for improvement of the coronary stents surfaces with the geometrical features proposed by prof. L. Poloński's group from the Silesian Centre for Cardiac Diseases in Zabrze, and made from the Cr-Ni-Mo austenitic steel [16÷18]. For implants remaining in contact with blood for more than 30 days, carrying, among others, their cytotoxicity and haemocompatibility tests is required - TABLE 1. In particular, the following tests were made within the research project framework:

- cytotoxicity tests on extracts,
- cytotoxicity tests in the direct contact,
- haemolysis test in the direct contact and from extract,
- blood coagulation test.

Following the recommendations in the relevant standards, the tests were made on the solid specimens made from the Cr-Ni-Mo steel. Specimens with the following features were made for the particular measurements:

- rectangular prism with the dimensions of 50x10x6 mm (the required minimum surface size of one of its walls subjected to the test is 50x3 mm) - cytotoxicity tests in the direct contact,
- cylinder with the diameter of $d = 10$ mm and height of $h = 8$ mm (the required minimum specimen weight is 4 g) - cytotoxicity test in the indirect contact (with extract),
- cylinder with the diameter of $d = 10$ mm and height of $h = 30$ mm (the required minimum specimen weight is 15 g) - haemolysis test,
- cylinder with the diameter of $d = 10$ mm and height of $h = 25$ mm (the required minimum total specimen surface size is 8 cm²) - coagulation test. Tests were carried out on specimens with the electrolytically polished and passivated surface, and on the electrolytically polished, passivated and coated with the carbon layer ones. The electro-chemical treatment (polishing) and the chemical one (passivation) were carried out in conditions worked out by the group of prof. J. Marciniak from the Silesian University of Technology in Gliwice. The deposition process of the carbon coating, using the rf PACVD method, was carried out in the Institute of Materials Engineering of the Technical University of Łódź in Łódź.

Testing methodology

Cytotoxicity tests

The cytotoxicity tests were carried out in the Cell Culture and Flow Cytometry Laboratory according to recom

cji Rozwoju Kardiochirurgii w Zabrze zgodnie z zaleceniami normy PN-ISO 10993-5 [19]. Przed rozpoczęciem badań próbki poddano procesowi sterylizacji z użyciem tlenku etylenu, a następnie wietrzono w areatorze. Do oznaczeń zastosowano linie komórkowe fibroblastów klon L 929 z American Type Culture Collection (ATCC). Zastosowane linie były wolne od mykoplazmy. Kultura macierzysta tych komórek jest przechowywana w laboratorium w duarach z ciekłym azotem w temperaturze -140°C w pożywce zawierającej DMSO, jako krioprotektant. Po ich rozmrożeniu usunięto krioprotektant poprzez jednokrotne płukanie i wirowanie z prędkością 1500 obr/min w ciągu 10 min. Po odwirowaniu usunięto supernatant, a pozostały precipitat rozpuszczono w odpowiedniej ilości medium 199. Do hodowli wykorzystano butelki hodowlane z filtrem o powierzchni 25 cm^2 . Komórki inkubowano w powietrzu zawierającym 5% CO_2 w temperaturze $37\pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Przed użyciem do badań fibroblasty pasażowano dwukrotnie.

Cytotoksyczność powierzchni badanych próbek oceniono na podstawie badań na ekstraktach oraz w bezpośrednim kontakcie. Jako środka ekstrakcyjnego użyto medium hodowlanego bez surowicy. Badane próbki umieszczono w probówkach Falconowskich o pojemności 50 ml, a następnie do każdej z nich dodano 20 ml medium hodowlanego. Ekstrakcję prowadzono w temperaturze $37\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ przez 48 h. Pozyskaną z hodowli macierzystej zawiesinę komórek umieszczono w medium hodowlanym. Następnie do każdej butelki odpipetowano po 10 cm^3 zawiesiny komórek. W dalszej kolejności hodowlę inkubowano, aż do uzyskania półzlewnej fazy wzrostu. Po uzyskaniu odpowiedniej zlewności komórek usunięto pożywkę hodowlaną z hodowli i do każdego z naczyń dodano 8 cm^3 świeżego medium oraz 2 cm^3 ekstraktu z poszczególnych próbek metalu i hodowano przez 48 h w tych samych warunkach. Dla każdej próbki wykonano 10 pomiarów. W celu uniknięcia kontaminacji medium hodowlane suplementowano antybiotykiem i środkiem grzybobójczym. Po okresie 48 h oznaczono działanie cytotoksyczne próbek poprzez pomiar żywotności komórkowej. Dla jej określenia wykorzystano technikę cytometrii przepływowej. Oznaczenia wykonywano na Cytometrze Przepływowym Ortho Diagnostic System, wyposażonym w laser argonowy o długości fali 488 nm. Jako barwnik przyżyciowy zastosowano Anexynę V oraz jodek propidyny (PI). Anexyna V wykazuje silne powinowactwo do błony komórkowej tych komórek, które znajdują się we wczesnej fazie apoptozy. Komórki, które przyłączyły Anexynę V wykazują zielone zabarwienie i klasyfikowane są jako apoptyczne. Zastosowany w pomiarach jodek propidyny jest barwnikiem wykazującym czerwone zabarwienie. Może on przenikać jedynie do wnętrza tych komórek, które wykazują naruszoną integralność błony komórkowej. Dlatego też komórki wykazujące czerwone zabarwienie klasyfikowane są jako martwe.

W badaniach w bezpośrednim kontakcie komórki uzyskane z hodowli macierzystej zawieszono w medium 199, a następnie do każdego z naczyń odpipetowano po 10 cm^3 zawiesiny komórek w medium hodowlanym. Komórki hodowano w atmosferze powietrza z 5% przepływem CO_2 w temperaturze w $37\pm 0,5^{\circ}\text{C}$, aż do uzyskania półzlewnej fazy wzrostu. Po uzyskaniu odpowiedniej gęstości komórek odrzucono medium hodowlane, a następnie do każdego z naczyń dodano po 10 cm^3 świeżego medium. W dalszej kolejności w poszczególnych naczyniach hodowlanych umieszczono ostrożnie badane próbki. Naczynia wraz z próbkami inkubowano przez 48 h w standardowych warunkach. Po tym czasie próbki poddano analizie, która obejmowała ocenę morfologii komórek oraz ich żywotności stosując jako barwnik błękit trypanu.

mentations of the PN-ISO 10993-5 standard [19]. The specimens were subjected to the sterilization process using the ethylene oxide, and were ventilated in the aerator afterwards. The fibroblast cell lines, clone L 929 from the American Type Culture Collection (ATCC), were used for determination. The lines used were free from mycoplasma. The stock culture of these cells is stored in the laboratory in Dewar flasks with liquid nitrogen at the temperature of -140°C in a medium containing DMSO, as a cryoprotectant. After their defrosting, the cryoprotectant was removed by rinsing them once and centrifuged at the rate of 1500 rpm for 10 min. After centrifugation, the supernatant was removed, and the resulting precipitate was dissolved in the relevant amount of the 199 medium. The culture bottles with filter with the 25 cm^2 surface area were used for culture. The cells were incubated in the air containing 5% CO_2 at the temperature of $37\pm 0,5^{\circ}\text{C}$. The fibroblasts were passaged twice before using for tests.

The cytotoxicity of the investigated specimens' surface was evaluated basing on tests made on extracts and in the direct contact. Culture medium without serum was used as the extractive agent. The investigated specimens were put into the Falcon flasks of 50 ml capacity, and next 20 ml of the culture medium was added to each one. Extraction was carried out at the temperature of $37\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ for 48 h. Suspended cells obtained from the stock culture were put into the culture medium. Next, 10 cm^3 of the cell suspension was measured off to each bottle. Further, the cultures were incubated, until the semi-liquid growth phase was obtained. After obtaining the relevant liquidity of cells, the medium was removed from the culture and 8 cm^3 of fresh medium and 2 cm^3 of extract of the particular metal specimens were added to each vessel, and cultured for 48 h in the same conditions. Ten measurements were made for each specimen. The culture medium was supplemented with the antibiotic and the fungicide to avoid contamination. After 48 h the cytotoxic activity of the specimens was determined by measurement of the cellular vitality. Flow cytometry was used to determine it. Determinations were made using the Ortho Diagnostic System Flow Cytometre, equipped with the 488 nm wavelength argon laser. Anexyne V and propidine iodide (PI) were used as an intravital stain. Anexyne V demonstrates a strong affinity to cell membrane of these cells that remain in the early apoptosis phase. The cells that attached Anexyne V show green colouring and are classified as apoptic. The propidine iodide used in the measurements is a red coloured dye. It can penetrate the interior of these cells only that reveal the impaired integrity of their membrane. Therefore, the red coloured cells are classified as necrotic.

In the direct contact tests, cells obtained from the stock culture were suspended in the 199 medium, and next 10 cm^3 of the cell suspension in the culture medium were measured off to each vessel. The cells were cultured in the air atmosphere with the 5% flow of CO_2 at the temperature of $37\pm 0,5^{\circ}\text{C}$, until the semi-liquid growth phase was reached. After obtaining the relevant cell density, the culture medium was rejected, and next 10 cm^3 of a fresh medium were added to each vessel. Further, the examined specimens were placed carefully in the particular culture vessels. The vessels with specimens were incubated for 48 h in standard conditions. After this time, the specimens were subjected to analysis, which included evaluation of morphology of cells and their vitality using trypan blue as the stain.

Tests for interactions with blood

Investigation of interactions of specimens with blood in the "in vitro" tests was carried out basing on the haemolysis

Badania interakcji z krwią

Badania interakcji próbek z krwią w badaniach "in vitro" przeprowadzono na podstawie testu hemolizy w bezpośrednim kontakcie i z ekstraktu oraz testu krzepnięcia zgodnie z zaleceniami normy ISO 10993-4 [20]. Badanie hemolizy w bezpośrednim kontakcie polegało na określeniu poziomu hemoglobiny w osoczu odzwierciedlającym stopień uszkodzenia błony komórkowej czerwonych krwinek w kontakcie z badanymi próbkami. Próbkki zostały umieszczone w probówkach, do których dodano cytrynianową krew. Probówki inkubowano przez okres 60 min. w temperaturze $37\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ w cieplarni, typ B20 firmy Heraeus. Po inkubacji usunięto krew do następnej probówki i wirowano przez 10 minut z prędkością $500 \times G$. Wirowanie wywołuje oddzielenie komórek nieuszkodzonych i lizy komórkowej. Zlizowane komórki pozostawiono w roztworze na spodzie probówki. Stopień lizy czerwonych krwinek i uwalniania hemoglobiny spowodowane przez badany materiał oceniano za pomocą spektrofotometru UV/VIS, typ UV 2101 PC, firmy Schimadzu przy długości fali 540 nm.

Badanie hemolizy z ekstraktu polegało na określeniu poziomu hemoglobiny w osoczu odzwierciedlającym stopień uszkodzenia błony komórkowej czerwonych krwinek w kontakcie z ekstraktem z badanego materiału. W celu przygotowania ekstraktu próbki były umieszczane w 0,9% roztworze NaCl w temperaturze 70°C przez okres 24 godzin. Tak przygotowany ekstrakt umieszczono w probówkach, do których dodano cytrynianową krew. Następnie próbki inkubowano przez okres 60 min w temp. 37°C w cieplarni, typ B20 firmy Heraeus. Po inkubacji usunięto krew do następnej probówki i wirowano przez 10 minut z prędkością $500 \times G$. Wirowanie wywołuje oddzielenie komórek nieuszkodzonych i lizy komórkowej. Zlizowane komórki pozostawiono w roztworze na spodzie probówki. Stopień lizy czerwonych krwinek i uwalniania hemoglobiny spowodowane przez badany materiał oceniano za pomocą spektrofotometru UV/VIS, typ UV 2101 PC, firmy Schimadzu przy długości fali 540 nm.

W badaniach krzepnięcia zastosowano osocze cytrynianowe. Osocze było poddawane działaniu badanego materiału statycznie. Po określonym czasie kontaktu z badaną powierzchnią wykonano:

- oznaczenie czasu protrombinowego (PT),
- oznaczenie czasu częściowej tromboplastyny (PTT).

Czas protrombinowy jest głównym skryningowym testem wykrywającym nieprawidłowości w krzepnięciu układu zewnątrzpochodnego. Zewnątrzpochodny mechanizm krzepnięcia krwi występuje po zetknięciu się krwi wpływającej z naczyń krwionośnych z uszkodzonymi tkankami. Podstawą tego testu jest optymalne stężenie jonów wapnia i nadmiar tromboplastyny. W teście tym mierzy się protrombinę i czynniki pomocnicze. W obecności tkankowej tromboplastyny czas krzepnięcia zależy od stężenia protrombiny, czynnika V, czynnika X. Osocze cytrynianowe dodawane było do probówek i umieszczane w inkubatorze koagulometru MCL 2 Instrumentation Laboratory w temp. $37\pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Następnie dodano odczynnik PT i roztwór chlorku wapnia do każdej probówki. Chlorek wapnia powoduje uwalnianie antykoagulantu i pozwala na przebiegnięcie procesu tworzenia skrzepu. Czas, który upływał do czasu powstania skrzepiny był oznaczany za pomocą koagulometru. Ocenę czasu protrombinowego dla każdej z próbek dokonano w odniesieniu do negatywnej próby kontrolnej.

Oznaczenie czasu częściowej tromboplastyny (PTT) stanowi główny skryningowy test wykrywający nieprawidłowości w krzepnięciu układu wewnątrzpochodnego. Wewnątrz

test in the direct contact and from the extract, as well as on the coagulation test, according to recommendations of the ISO 10993-4 standard [20]. The haemolysis test in the direct contact consisted in determining the haemoglobin level in blood plasma, reflecting the extent of the erythrocytes' cell membrane damage in contact with the examined specimens. The specimens were placed in test-tubes to which the citrated blood was added. The test-tubes were incubated for 60 min at the temperature of $37\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ in the Heraeus B20 thermostat. After incubation the blood was removed to the next test-tube and centrifugalized for 10 min at the $500\times G$ rate. Centrifugation separates the cells that are free of damage and the cellular lysis. Lysated cells were left in the solution at the bottom of the test-tube. The extent of the erythrocytes' lysis and release of the haemoglobin caused by the investigated material was determined using the Schimadzu UV/VIS spectrophotometer, UV 2101 PC type, at the 540 nm wavelength.

Testing of haemolysis from the extract consisted in determining the haemoglobin level in blood plasma, reflecting the extent of the erythrocytes' cell membrane damage in contact with the extract from the examined material. To prepare the extract, the specimens were placed in the 0,9% solution of NaCl at the temperature of 70°C for 24 hours. The extract prepared in this way was placed in the test-tubes, to which the citrated blood was added. Next, the test-tubes were incubated for 60 min at the temperature of 37°C in the Heraeus B20 thermostat. After incubation the blood was removed to the next test-tube and centrifugalized for 10 min at the $500\times G$ rate. Centrifugation separates the cells that are free of damage and the cellular lysis. Lysated cells were left in the solution at the bottom of the test-tube. The extent of the erythrocytes' lysis and release the haemoglobin caused by the investigated material was determined using the Schimadzu UV/VIS spectrophotometer, UV 2101 PC type, at the 540 nm wavelength.

The citrated blood plasma was used in coagulation tests. The plasma was subjected statically to the activity of the investigated material. After the specified contact duration time with the investigated surface the following determinations were made:

- determination of the prothrombin time (PT),
- determination of the partial thromboplastine time (PTT).

The prothrombin time is the main screening test revealing abnormalities in the extrinsic pathway blood coagulation. The extrinsic mechanism of blood coagulation occurs when the blood flowing from the blood vessels gets into contact with the damaged tissues. The basis of this test is the optimum concentration of calcium ions and excess of thromboplastine. Prothrombin and ancillary factors are measured in this test. The blood coagulation time depends on the concentration of prothrombin, factor V, and factor X, in the presence of the tissue thromboplastine. The citrated blood plasma was added to the test-tubes and placed in the MCL 2 Instrumentation Laboratory coagulometer incubator at the temperature of $37\pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Next, the PT reagent and calcium chloride were added to each test-tube. Calcium chloride causes releasing of the anticoagulant and allows the blood clot formation process to proceed. Time duration to development of the thrombus was determined using the coagulometer. Determination of the prothrombin time for each specimen was carried out in relation to the negative control test.

Determination of the partial thromboplastine time (PTT) features the main screening test revealing abnormalities in the intrinsic pathway blood coagulation. The intrinsic mechanism of blood coagulation is revealed by the blood contact with materials or compounds with the negative charge. This

pochodny mechanizm krzepnięcia krwi ujawnia się wskutek konyaktu krwi z materiałami lub związkami o ładunku ujemnym. Test ten określa czas krzepnięcia rekalcynowego cytrynianowego osocza pod wpływem dodania częściowej tromboplastyny. Osocze cytrynianowe dodawane było do probówek, które umieszczano w inkubatorze koagulometru w temp. $22\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ przez okres 60 minut. Następnie dodano odczynnik PTT na okres 3 min. W dalszej kolejności do każdej probówki dodano roztwór chlorku wapnia. Chlorek wapnia powoduje uwalnianie antykoagulantu i pozwala na przebiegnięcie procesu tworzenia skrzepu. Czas, który upływał do czasu powstania skrzepiny był oznaczany za pomocą koagulometru. Ocenę czasu częściowej tromboplastyny dla każdej z próbek dokonano w odniesieniu do negatywnej próby kontrolnej.

Wyniki badań

Badania cytotoksyczności

Wyniki badań cytotoksyczności próbek o zróżnicowanym sposobie przygotowania powierzchni zamieszczono w TABELI 2 i na RYS.1. W badaniach przeprowadzonych na ekstraktach, średnia wartość określająca ilość żywych komórek oceniana dla próby kontrolnej (fragmenty drenów) wynosiła około 80,6%.

Dla próbek o powierzchni polerowanej elektrolitycznie i spasywowanej oraz dla próbek z dodatkowo naniesioną warstwą węglową wartość ta uległa zmniejszeniu koło 15% i wynosiła odpowiednio 64,11% oraz 65,68% - TABLICA 2, RYS. 1. W konsekwencji uzyskano również zróżnicowanie ilości komórek apoptycznych i martwych. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że wartość średnia określająca ilość komórek apoptycznych wynosiła odpowiednio 17,95% (dla próby kontrolnej), 8,18% (dla próbek o powierzchni polerowanej elektrolitycznie i spasywowanej) oraz 14,12% (dla próbek z dodatkowo naniesioną warstwą węglową). Natomiast dla komórek martwych wartości te wynosiły odpowiednio 1,50%, 27,72% oraz 20,21% - TABLICA 2.

Sposób przygotowania powierzchni próbek Specimen surface preparation	Rodzaj ocenianych komórek Cell type	Ilość ocenianych komórek, [%] Quantity of cells, [%]		
		min.	max	Średnia average
Próba kontrolna Control test	Żywe Live	80,40	80,70	80,60
	Apoptyczne Apoptic	17,9	18,1	17,95
	Martwe Necrotic	1,50	1,50	1,50
Polerowane elektrolitycznie i spasywowane Electrolytically polished and passivated	Żywe Live	48,30	83,10	64,11
	Apoptyczne Apoptic	5,10	14,10	8,18
	Martwe Necrotic	2,70	44,50	27,72
Polerowane elektrolitycznie, spasywowane z naniesioną warstwą węglową Electrolytically polished and passivated with the carbon coating deposited	Żywe Live	54,50	77,90	65,68
	Apoptyczne Apoptic	7,40	38,60	14,12
	Martwe Necrotic	6,90	33,40	20,21

TABELA 2. Wyniki badań cytotoksyczności na ekstraktach
TABLE 2. Results of the cytotoxicity tests on extracts

test determines the time duration of coagulation of the recalcinated citrated blood plasma under the influence of adding of the partial thromboplastine. The citrated blood plasma was added to the test-tubes, which were placed in the coagulometer incubator at the temperature of $22\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ for 60 minutes. Next the PTT reagent was added for 3 minutes. Further, the calcium chloride solution was added to each test-tube. Calcium chloride causes releasing of the anticoagulant and allows the blood clot formation process to proceed. Time duration to development of the thrombus was determined using the coagulometer. Determination of the partial thromboplastine time for each specimen was carried out in relation to the negative control test.

Test results

Cytotoxicity tests

Results of the cytotoxicity tests of specimens with the diversified surface preparation methods are included in TABLE 2 and in FIG. 1. In tests carried out on extracts the average value of the live cells quantity determined in the control test (fragments of drains) was about 80,61%. For specimens with the electrolytically polished and passivated surfaces, and also for the specimens with the additionally deposited carbon coating this value decreased by about 15%, being 64.11% and 65.68% respectively - TABLE 2, FIG.1. As a consequence, diversification of the apoptic and necrotic cells' quantities was obtained also. Basing on tests carried out it was found out that the average value of the apoptic cells quantity was 17.95% (for the control test), 8.18% (for specimens with the electrolytically polished and passivated surfaces), and 14.12% (for specimens with the additionally deposited carbon coating) respectively, while for the necrotic cells these values were 1.50%, 27.72%, and 20.21% respectively - TABLE 2.

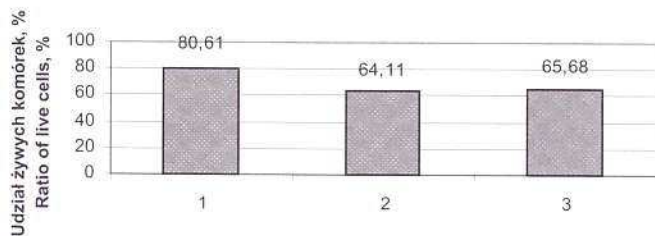
Observation of the cells in culture, subjected to the direct contact with the surfaces of the investigated specimens did not reveal, in any case, any significant changes of their morphology - FIG. 2. The cells grew uniformly around the specimens - FIG. 2d. The additional analysis carried out with the stain (trypan blue) did not reveal any significant decrease of vitality of the evaluated cells.

Tests for interactions with blood

Test results of interaction of the implants with blood are presented in TABLE 3 and in FIG. 3. The average of three determinations for each series of tests was assumed as the test result, after rejecting the extreme results, in regard to the negative and positive control tests. In evaluation of the haemolysis extent in the direct contact, the value of 1.54% was obtained for the polished and passivated specimen, whereas, for the polished and passivated specimen with the carbon coating the value of 1.23% was obtained. The results obtained for both specimens did not exceed the value of 3.0% obtained in the positive control test - FIG. 3.

In evaluation of the haemolysis extent from the extract, the value of 0.53% was obtained for the polished and passivated specimen, whereas, for the polished and passivated specimen with the carbon coating the value of 0.89% was obtained. Also in this case the obtained results did not exceed the value of 1.2% obtained in the positive control test - FIG. 3.

Test results of the influence of the developed passive and carbon coatings on the extrinsic pathway blood coagulation mechanism are presented in Table 3. The prothrombin



RYS. 1. Wyniki badań cytotoksyczności przeprowadzonych na ekstraktach: 1 - dla próby kontrolnej, 2 - dla próbki o powierzchni polerowanej elektrolitycznie i spasywowanej, 3 - dla próbki o powierzchni polerowanej elektrolitycznie, spasywowanej z naniesioną warstwą węglową

FIG. 1. Results of the cytotoxicity tests carried out on extracts: 1 - for the control test, 2 - for the specimen with the electrolytically polished and passivated surface, 3 - for the specimen with the electrolytically polished and passivated surface with the carbon coating deposited

Obserwacja komórek w hodowli poddanych bezpośredniemu kontaktowi z powierzchnią badanych próbek w żadnym przypadku nie wykazała istotnych zmian ich morfologii -RYS. 2. Komórki równomiernie wzrastały wokół próbek - RYS.2d. Dodatkowo przeprowadzona analiza z wykorzystaniem barwnika (błękitu trypanu) nie wykazała istotnych zmian obniżenia żywotności ocenianych komórek.

Badania interakcji z krwią

Wyniki badań interakcji implantów z krwią przedstawiono w TABELI 3 oraz na RYS. 3. Jako wynik badania przyjęto średnią z trzech oznaczeń z każdej serii badań po odrzuceniu wyników skrajnych w odniesieniu do kontrolnej próby negatywnej i pozytywnej. Przy ocenie stopnia hemolizy w kontakcie bezpośrednim, dla próbki polerowanej i spasywowanej uzyskano wynik 1,54%, natomiast dla próbki polerowanej, spasywowanej, z naniesioną warstwą

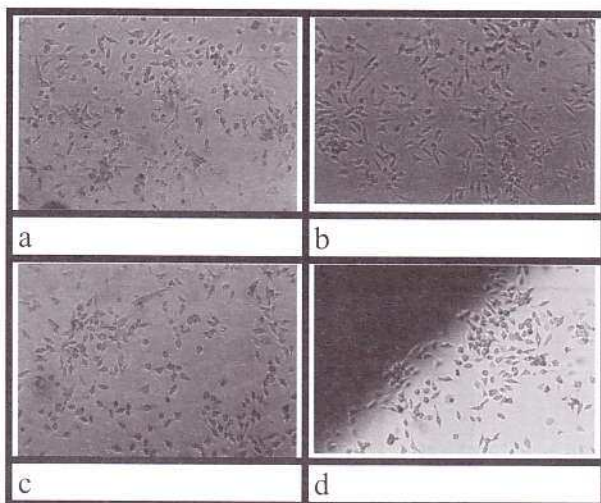
time (PT) was 11.7 sec for specimens with the electrolytically polished and passivated surface, and it was 12.1 sec for the electrolytically polished and passivated carbon coated specimens. The obtained results differ slightly from the value obtained in the control test which was 11.5 sec.

The influence of the developed coatings on the intrinsic pathway blood coagulation mechanism was determined by the partial thromboplastine time (PTT) measurement. Test results indicate that the obtained PTT value for the polished and passivated specimens was 29 sec, whereas for the specimens with the additionally deposited carbon coating the value of 31.5 sec was obtained. Measurements carried out for the control test revealed that the PTT time value was 28 sec.

Summary

The investigations carried out feature a part of the research work conducted by the Centre for Biomedical Engineering of the Silesian University of Technology in co-operation with the Silesian Centre for Cardiac Diseases in Zabrze. The main goal of the realised research is working out the technology of development of the passive-carbon coating on the surfaces of coronary stents, ensuring their good biotolerance, ease of implantation using the catheter for coronary angioplasty, and a relatively low price.

The initial evaluation of the biotolerance of the proposed coatings in the blood environment was made in the presented work, including their cytotoxicity tests and interactions with blood (determination of the prothrombin time PT and the partial thromboplastine time PTT). The decrease of the live cells average quantity by about 15% for the examined coatings in comparison with the control test, should be regarded as the positive result, attesting to their low toxicity. Examinations of cells subjected in the culture to the direct contact with the surface of the passive, and passive-carbon coatings did not reveal any significant changes in their morphology. One should also evaluate as very advantageous test results of the influence of the specimens' surfaces with the deposited coatings on the extrinsic- and intrinsic pathway blood clotting mechanisms. Therefore, the biotolerance of the passive and passive-carbon coatings developed on the surface of the austenitic steel, evaluated according to the pertaining standards for the "in vitro" tests is good. The more detailed investigations should be conducted, according to authors, using the proposed stent geometrical features with the deposited passive- and passive-carbon coatings in the environment of flowing blood.



RYS. 2. Morfologia komórek po badaniach cytotoksyczności w kontakcie bezpośrednim: a - próba kontrolna, b - z próbka polerowaną elektrolitycznie i spasywowaną, c - z próbka polerowaną elektrolitycznie, spasywowaną z naniesioną warstwą węglową, d - z próbka z naniesioną warstwą węglową w obszarze jej krawędzi

FIG. 2. Morphology of cells after the cytotoxicity tests in direct contact:

a - control test, b - with the electrolytically polished and passivated specimen, c - with the specimen electrolytically polished, passivated, and with the deposited carbon coating, d - with the carbon coated specimen in the edge area

węglową uzyskano wartość 1,23%. Uzyskane rezultaty dla obydwu próbek nie przekroczyły wartości 3,0% uzyskanej w próbie kontrolnej pozytywnej - RYS. 3.

Oceniając stopień hemolizy z ekstraktu przy badaniu próbki polerowanej i spasywowanej uzyskano wynik 0,53 %, a dla próbki polerowanej, spasywowanej z naniesioną warstwą węglową wartość ta wynosiła 0,89 %. Również w tym przypadku otrzymane wyniki nie przekroczyły wartości 1,2% uzyskanej dla próby kontrolnej pozytywnej - RYS. 3.

Wyniki badań wpływu wytworzonych warstw pasywnej i węglowej na zewnątrzpochodny mechanizm krzepnięcia krwi przedstawiono w tabelicy 3. Dla próbek o powierzchni polerowanej elektrolitycznie i spasywowanej wartość czasu protrombinowego (PT) wynosiła 11,7 sekundy, a dla próbek polerowanych elektrolitycznie, spasywowanych z naniesioną warstwą węglową 12,1 sekundy. Uzyskane wyniki nieznacznie różnią się od wartości uzyskanej dla próby kontrolnej, która wynosiła 11,5 sekundy.

Wpływ wytworzonych warstw na wewnętrzzochodny mechanizm krzepnięcia krwi oceniano poprzez pomiar czasu częściowej tromboplastyny (PTT). Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, iż uzyskana wartość PTT dla próbek polerowanych i spasywowanych wynosiła 29 sekund, natomiast dla próbek z dodatkowo naniesioną warstwą węglową uzyskano wartość 31,5 sekundy. Pomiar przeprowadzone dla próby kontrolnej wykazały, iż wartość czasu PTT wynosiła 28 sekund.

Acknowledgements

The work was realised within the framework of the research project No 7 T08C 057 17 financed by the Polish State Committee for Scientific Research[11].

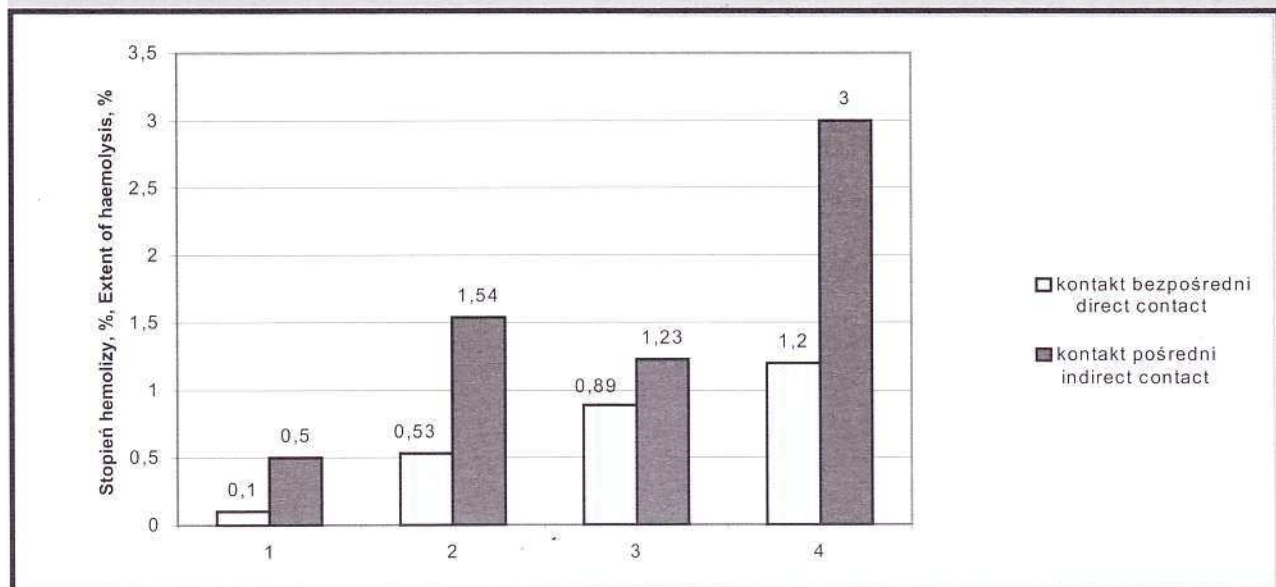
Piśmiennictwo

References

- [1] Marciniak J.: Biomateriały. Wydawnictwo Politechniki Śląskiej, Gliwice 2002.
- [2] Paszenda Z.: Wpływ struktury podłoża odlewniczego stopu Co-Cr-Mo na własności fizykochemiczne warstwy węglowej. Praca doktorska, Politechnika Śląska, Gliwice 1996.
- [3] Paszenda Z., Marciniak J.: The influence of base structure and carbon coating on the corrosion resistance of Co-Cr-Mo alloy. Journal of Materials Processing Technology, 1998, 78, 143-149.
- [4] Niedzielski P.: Wytwarzanie warstw nanokrystalicznego diamentu na potrzeby medycyny. Praca doktorska, Politechnika Łódzka, Łódź 1998.

Rodzaj próbki Specimen type	Czas protrombinowy PT, [s] Prothrombin time PT, [sec]	Czas częściowej tromboplastyny PTT, [s] Partial thromboplastine time PTT, [sec]
polerowana elektrolitycznie i spasywowana Electrolytically polished and passivated	11,7	29
polerowana elektrolitycznie, spasywowana z naniesioną warstwą węglową Electrolytically polished and passivated	12,1	31,5
próba kontrolna Control test	11,5	28

TABELA 3. Wyniki badań krzepnięcia krwi
TABLE 3. Blood clotting test results



RYS. 3. Wyniki badań hemolizy: 1 - próba kontrolna negatywna, 2 - próbka polerowana elektrolitycznie i spasywowana, 3 - próbka polerowana elektrolitycznie, spasywowana z naniesioną warstwą węglową, 4 - próba kontrolna pozytywna

FIG. 3. Haemolysis test results: 1 - negative control test, 2 - electrolytically polished and passivated specimen, 3 - electrolytically polished and passivated, carbon coated specimen, 4 - positive control test

Podsumowanie

Przeprowadzone badania stanowią fragment prac prowadzonych w Centrum Inżynierii Biomedycznej Politechniki Śląskiej we współpracy ze Śląskim Centrum Chorób Serca w Zabrzu. Zasadniczym celem realizowanych badań jest opracowanie technologii wytwarzania warstwy pasywno-węglowej na powierzchni stentów wieńcowych gwarantującej im dobrą biotolerancję, łatwość implantacji przy użyciu cewnika do angioplastyki wieńcowej i relatywnie niską ceną.

W prezentowanej pracy przeprowadzono wstępną ocenę biotolerancji proponowanych warstw w środowisku krwi obejmującą badania ich cytotoksyczności oraz interakcji z krwią (oznaczenie czasu protrombinowego PT i czasu częściowej tromboplastyny PTT). Uzyskane w badaniach cytotoksyczności zmniejszenie średniego udziału żywych komórek dla badanych warstw o około 15% w odniesieniu do próby kontrolnej należy traktować jako wynik pozytywny, świadczący o małej ich toksyczności. Przeprowadzone badania komórek poddanych w hodowli bezpośredniemu kontaktowi z powierzchnią warstw pasywnej oraz pasywno-węglowej nie wykazały istotnych zmian w ich morfologii. Również badania wpływu powierzchni próbek z naniesionymi warstwami na zewnątrz- i wewnątrzpochodny mechanizm krzepnięcia krwi ocenić należy bardzo pozytywnie. A zatem biotolerancja warstw pasywnej oraz pasywno-węglowej wytworzonych na powierzchni stali austenitycznej oceniana na podstawie obowiązujących standardów w badaniach *in vitro* jest dobra. Bardziej szczegółowe badania zdaniem autorów należy przeprowadzić z wykorzystaniem proponowanej postaci stentów z naniesionymi warstwami pasywną oraz pasywno-węglową w środowisku przepływającej krwi.

Podziękowania

Praca została zrealizowana w ramach projektu badawczego nr 7 T08C 057 17 finansowanego przez Komitet Badań Naukowych [11].

[5] Marciniak J., Boba J., Paszenda Z., Mitura S.: Einfluß von Passivierungs- und Kohlenstoffschichten auf austenitischen CrNiMo-Stählen auf die Beständigkeit gegen Lochfraß und Spannungsrisskorrosion. *Werkstoffe und Korrosion*, 1993, 44, 379+383.

[6] Boba J.: Wpływ wytypowanych powłok ochronnych na odporność korozyjną implantów ze stali 00H17N14M2A. Praca doktorska, Politechnika Śląska, Gliwice 1992.

[7] Marciniak J., Kaczmarek M.: Korozja naprężeniowa implantów ze stali Cr-Ni-Mo pokrytych warstwą diamentową. Międzynarodna konferencja "Materialove Inzenyrstvi - Nove Materialy a Technologie", Liberci 2000, 105.

[8] Niedzielski P., Mitura S., Paszenda Z., Marciniak J.: Diamond coated implants for medicine. 8th Int. Sci. Conf. "Achievements in Mechanical and Materials Engineering", Rydzyna 1999, s. 569.

[9] Mitura S., Marciniak J., Niedzielski P., Paszenda Z.: Warstwy diamentowe na implantach dla traumatologii. *Inżynieria Biomateriałów* 1999, 7, 8, 65+72.

[10] Koczy B., Marciniak J.: Biotolerancja implantów ze stali AISI 316L z warstwami pasywnymi i pasywno-diamentowymi. *Inżynieria Biomateriałów*, 2000, 11, s. 23-31.

[11] Marciniak J., Poloński L., Paszenda Z., Wilczek K.: Projekt badawczy KBN nr 7 T08C 057 17. Politechnika Śląska, Centrum Inżynierii Biomedycznej, Gliwice 1999-2002.

[12] Marciniak J., Poloński L., Paszenda Z., Wilczek K.: Biomateriały metaliczne z warstwami pasywno-węglowymi dla kardiologii zabiegowej. *Problemy Eksploatacji* 2000, 2, 205+211.

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

[14] Solski L., Paluch D., Krzywosiński L.: Krajowe procedury normalizacyjne dotyczące biomateriałów na przykładzie normy ISO 10993: Biologiczna ocena wyrobów medycznych. *Inżynieria Biomateriałów*, 7, 8, 1999, s. 60-65.

[15] Zalewski W.: Metody badania biomateriałów do kontaktu z krwią, w: Nałęcz M. (red.): *Problemy biocybernetyki i inżynierii biomedycznej*. Wyd. Komunikacji i Łączności, Warszawa 1990, t.4, s. 169-184.

[16] De Scheerder K., Wilczek K. et al.: Experimental Results and Initial Clinical Experience with a Home - Made Coronary Stent in U. Sigwart (edit.) *Endoluminal Stenting 1996* London, Saunders Co, p.238.

[17] De Scheerder I., Wang K., Wilczek K.: 'The STS Coronary Stents' in: Patrick W. Serruys (edit.) *Handbook of Coronary Stents 1997*, Martin Dunitz Ltd. p.119.

[18] Paszenda Z., Marciniak J., Będziński R., Rusiński E., Smolnicki T.: Biomechanical characteristics of the stent-coronary vessel system. *Acta of Bioengineering and Biomechanics*, 2002, vol. 4, 1, 81+89.

[19] PN-ISO 10993-5-1997: Biologiczna ocena wyrobów medycznych. Badania cytotoksyczności - metody *in vitro*.

[20] ISO 10993-4-1997: Biological evaluation of medical devices - Part 4. Selection of tests for interactions with blood.