

Ze względu na większy gradient ciśnień uznaje się że zastawka w lewej komorze serca ma trudniejsze warunki pracy. Zakłada się że zastawka która będzie zbadana w trudniejszych warunkach będzie równie dobrze pracować w zakresie niższych ciśnień. Dzięki tym założeniom stanowisko badawcze zostało uproszczone do pojedynczego obiegu zasilanego przez jedną pompę. W którym gradient ciśnień odpowiada gradientowi ciśnień w układzie systemowym człowieka.

Stanowisko zostało przedstawione na RYSUNKU 2. Pozwala ono na wykonanie 1000 cykli (uderzeń serca) w ciągu 1 minuty. Dzięki temu doświadczenie może zostać skrócone 14-krotnie.

Przedstawienie innych rozwiązań

Jest wiele różnych sposobów rozwiązywania problemów. Dla badań zmęczeniowych sztucznej zastawki serca przedstawiono poniżej dwa różne rozwiązania dla uzyskania pulsacyjnego przepływu niezbędnego do symulacji naturalnego przepływu przez zastawkę. Porównanie obu rozwiązań przedstawia RYSUNEK 3.

Najważniejsza różnica pomiędzy tymi dwoma rozwiązaniami polega na wytworzeniu pulsacyjnego charakteru przepływu cieczy przez sztuczną zastawkę serca. Na rysunku po lewej stronie wedle rozwiązania w Achen przepływ cieczy wymuszony jest przez ruch stołu wymuszającego zmianę ciśnienia w komorze ciśnienia, podczas gdy na rysunku po prawej stronie charakter przepływu z ciągłego zmieniony jest dzięki obrotowemu wałkowi z otworem poprzecznym zmieniając charakter przepływu z ciągłego na pulsacyjny. Takie rozwiązanie umożliwia zwiększenie częstości pracy zastawki.

TROMBOZGODNOŚĆ WARSTW NCD NA POWIERZCHNI STOPÓW TYTANOWYCH

OKRÓJ W.*, JAKUBOWSKI W.*, PRZYBYSZEWSKA I.*, PIREK M.*, KOMOROWSKI P.*, MRUKLIK M.*, SZYMAŃSKI W.*, KOŚĘDA P.*, WALKOWIAK B.**

*INSTYTUT INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ POLITECHNIKA ŁÓDZKA ŁÓDŹ
**ZAKŁAD BIOFIZYKI MOLEKULARNEJ I MEDYCZNEJ, UNIWERSYTETU MEDYCZNEGO, ŁÓDŹ

Kontakt biomateriałów z krwią jest zjawiskiem nie do końca wyjaśnionym. Interakcje powierzchni implantów lub sprzętu medycznego z krwią nie powinny powodować uszkodzenia elementów morfotycznych krwi, zmieniać składu elektrolitów, zmieniać struktury białek, blokować czynności enzymów oraz wpływać na proces krzepnięcia krwi. Materiały krwiozgodne nie mogą też wywoływać w otaczających tkankach efektów toksycznych, alergizujących ani też skutków mutagennych [1, 2].

Warstwy węglowe, otrzymywane z zastosowaniem różnych technik, wydają się być obiecującymi modyfikacjami powierzchni implantów do kontaktu z krwią, nie tylko dzięki ich znakomitemu własnościom fizycznym ale także ze względu na ich skład chemiczny, który czyni je biozgodnymi. [3, 4, 5].

Celem pracy było porównanie trombozgodności stopu tytanu Ti6Al4V, TiN z powierzchnią tych samych materiałów pokrytych warstwą nanokrystalicznego diamentu (NCD).

The way of generation of pulsating flow supplying the test chamber with an artificial heart valve is the main difference of presented test rigs. In the Aachen solution one can observe that flow of liquid is forced by movement of plate driving pressure capsule while in set-up designed at TU of Lodz liquid is flowing continuously (owing to the continuous pump operation) a rotating shaft with holes creates pulsating flow. Such solution allows one to increase the frequency of heart valve operation.

Piśmiennictwo

References

- [1] Bochenek A., Reicher M., "Anatomia człowieka", Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, Warszawa, 1974.
- [2] Nawrat Z., Materiały wewnętrzne i sprawozdania Fundacji Rozwoju Kardiologii Instytutu Protez Serca w Zabrze, Zabrze, 2000.
- [3] Pawlicki G., "Podstawy inżynierii medycznej" Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej, Warszawa, 1997.
- [4] Traczyk W., Trzebski A., "Fizjologia człowieka z elementami fizjologii stosowanej i klinicznej", Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, Warszawa, 1990.
- [5] Papers of Technical University of Aachen.

THROMBOCOMPATIBILITY OF NCD LAYERS ON A SURFACE OF TITANIUM ALLOYS

OKRÓJ W.*, JAKUBOWSKI W.*, PRZYBYSZEWSKA I.*, PIREK M.*, KOMOROWSKI P.*, MRUKLIK M.*, SZYMAŃSKI W.*, KOŚĘDA P.*, WALKOWIAK B.**

*INSTITUTE OF MATERIAL SCIENCES AND ENGINEERING, TECHNICAL UNIVERSITY OF LODZ- POLAND
**DEPARTMENT OF MOLECULAR AND MEDICAL BIOPHYSICS, MEDICAL UNIVERSITY OF LODZ, POLAND

The contact of biomaterials with blood is a not yet fully explained phenomenon. Interactions of implant surface or medical equipment with blood should not cause damages of blood cells, change electrolyte composition, alter protein structure, block enzymatic activity or influence blood clotting. Blood-compatible materials must not cause toxic or allergenic effects in surrounding tissues or develop mutagenic effects [1,2].

Carbonic layers obtained via various techniques seem to be promising modifications of implant surface for contact with blood not only because of their chemical composition which makes them biocompatible [3,4,5].

The aim of this study was to compare thrombocompatibility of titanium alloy Ti6Al4V, TiN with a surface of the same materials but covered with a layer of nanocrystalline diamond (NCD).

Materiał do badań:

Do badań użyto krążków grubości 3 mm i średnicy 8 mm wykonanych ze stopu tytanu (Ti6Al4V) i takich samych krążków pokrytych azotkiem tytanu (TiN) metodą implantacji jonowej. Powierzchnia próbek była obrabiana mechanicznie poprzez obróbkę skrawaniem. Część krążków została pokryta warstwą NCD metodą Radio Frequency Plasma Chemical Vapour Deposition (RF PCVD).

Kontakt badanych powierzchni z krwią:

Próbki przed eksperymentem umyto dwukrotnie w wodzie destylowanej a następnie w etanolu. Krew pobierano, zgodnie z Deklaracją Helsińską, od zdrowych ochotników, którzy nie stosowali żadnych leków antyplateletowych w ostatnich trzech tygodniach przed badaniem. Jako antykoagulantu użyto 3,8% cytrynianu sodu (1:9, v:v), a następnie krew odwirowano (1000xg, 10 min) w celu uzyskania osocza ubogopłytkowego. Wszystkie próbki (Ti6Al4V, TiN, Ti6Al4V+NCD, TiN+NCD) umieszczano w osoczu ubogopłytkowym na kilkanaście godzin w temperaturze 4°C. Następnie próbki płukano dwukrotnie w 10mM buforze fosforanowym PBS o pH 7,4 (zawierającym 140 mM NaCl). Kolejny etap to kontakt próbek z pełną krwią cytrynianową przez 1 godzinę, przy zapewnieniu ciągłego ruchu krwi w probówce.

Przygotowanie próbek do obserwacji w skaningowym mikroskopie elektronowym:

Próbki utrwalano w 2,5% aldehydzie glutarowym przygotowanym w 0,1M buforze fosforanowym o pH 7,4 przez 1 godzinę w temperaturze 4°C. Następnie płukano je w buforze fosforanowym dwa razy po 10 minut. Badane powierzchnie odwadniano stosując szereg alkoholi o wzrastającym stężeniu, suszono na powietrzu i napyłano 20-30 nm warstwą złota w napyłarce JEOL JEE-4X. Obserwacji dokonywano w mikroskopie skaningowym HITACHI-3000 N przy napięciu 5 kV.

Wyniki**Kontakt krwi pełnej z powierzchnią stopu Ti6Al4V i Ti6Al4V+NCD**

Po jednogodzinnym kontakcie z pełną krwią powierzchnie stopu tytanu Ti6Al4V stwierdza się obecność licznie zaadherowanych płytek krwi oraz pojedyncze leukocyty o średnicy około 5 μm (RYS. 1a). Większe powiększenia mikroskopowe ujawniają, że płytki posiadają długie, liczne pseudopodia. Krwinki płytkowe przylegają do podłoża pojedynczo lub tworzą niewielkie 2-3 płytkowe zespoły (RYS. 1b). Średnio na 100 mm^2 powierzchni stopu tytanu przypada 3,4 płytki krwi. Natomiast na powierzchni NCD nałożonej na stop tytanu Ti6Al4V, po kontakcie z krwią, obserwowano również liczne płytki krwi rozłożone równomiernie na całej powierzchni próbek. Spotykano też niekiedy leukocyty o średnicy 5 μm^2 (RYS. 1c). Płytki krwi przylegają pojedynczo i posiadają liczne, cienkie i długie wypustki (RYS. 1d). Obliczono, że na 100 mm^2 powierzchni tego stopu pokrytego warstwą NCD zaadherowane są średnio 2 płytki krwi, co stanowi około 59 % liczby płytek obserwowanych na stopie tytanu bez warstwy NCD.

Kontakt krwi pełnej z powierzchnią TiN i TiN+NCD

Po kontakcie z pełną krwią, na powierzchni azotku tytanu stwierdzono przede wszystkim liczne leukocyty oraz niewielką liczbę płytek krwi (RYS. 2a). Wszystkie leukocyty są kształtu kulistego i mają tę samą wielkość - około 5 μm średnicy. Płytki krwi natomiast są różnokształtne i posiadają

Materials and methods**Material for study:**

Round bars, 3 mm thick and 8 mm in diameter made of titanium alloy (Ti6Al4V) and similar round bars covered with titanium nitride (TiN) by ionic implantation, were used for the study. Surface of samples was mechanically treated through machining. Part of the samples was covered with NCD layer according to Radio Frequency Chemical Vapor Deposition (RF PCVD) method.

Contact of studied surfaces with blood:

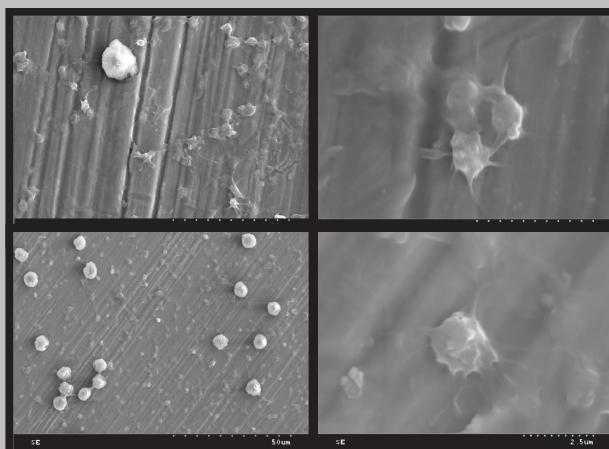
Samples were washed twice, before the experiment. Once in distilled water and then in ethanol washer. Blood was collected, according to Helsinki Declaration, from healthy volunteers who had not used any anti-platelet drugs for the last three weeks before the experiment. 3.8% sodium citrate (1:9, v:v) was used as a anticoagulant and next blood was centrifuged (1000 x G, 10 minutes) in order to obtain platelet poor plasma (PPP). All the samples (Ti6Al4V, TiN, Ti6Al4V+NCD, TiN+NCD) were placed in platelet poor plasma for several hours in temperature 4°C. Then samples were rinsed twice in 10 mM phosphatic buffer PBS with pH 7.4 (containing 140 mM NaCl). Next stage was the contact of the samples with whole citrate blood for one hour, with continuous movement of blood in test tube.

Preparation of samples for observation in scanning electron microscope:

The samples were fixed in 2.5% glutaraldehyde prepared in 0.1 M phosphatic buffer with pH 7.4 for one hour in temperature 4°C. Then they were twice rinsed in phosphatic buffer and gradually increasing concentration of ethanol, air dried and sputter with 20-30 nm layer of gold in JEOL JEE-4X sputtering apparatus. Observations were made under scanning electron microscope HITACHI-3000 N with voltage 5 kV.

Results**Contact of whole blood with surfaces of alloys Ti6Al4V and Ti6Al4V+NCD**

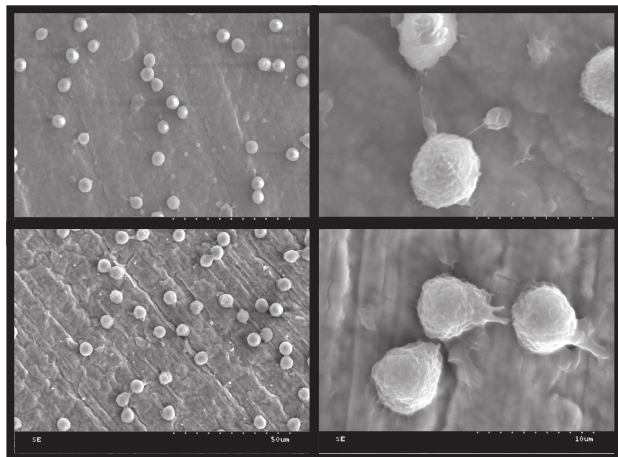
After one hour exposition of Ti6Al4V alloy surface to whole blood a presence of numerous adhered blood platelets and single leukocytes of diameter app. 5 μm were found (FIG.



RYS. 1. Obraz powierzchni stopu tytanu Ti6Al4V (a,b) oraz powierzchni Ti6Al4V pokrytego warstwą NCD (c,d) po kontakcie z krwią.

FIG. 1. Image of Ti6Al4V titanium alloy surface (a,b) and surface of Ti6Al4V covered with NCD layer (c,d) after exposure to blood.

różną liczbę wypustek (RYS. 2b). Liczba płytek przypadająca na 100 mm^2 wynosi 0,42. Po pokryciu azotku tytanu warstwą NCD stwierdzono na tej powierzchni również dużą liczbę leukocytów, które wydają się być w ściślejszym kontakcie z podłożem, ponieważ często obserwuje się wytwarzanie wypustek cytoplazmatycznych przez te komórki. Natomiast liczba zaadherowanych płytek zdecydowanie maleje, bo na 100 mm^2 przypada ich średnio ok. 0,2, co stanowi 47% liczby płytek obserwowanych na powierzchni azotku tytanu (RYS. 2c, d).



RYS. 2. Powierzchnia azotku tytanu TiN (a,b) i azotku tytanu z naniesioną warstwą NCD (c,d) po jednogodzinnym kontakcie z krwią.

FIG. 2. Surface of titanium nitride TiN (a,b) and titanium nitride with of NCD layer (c,d) after a contact. with blood for one hour.

Dyskusja

Pierwszą reakcją na kontakt krwi ze sztuczną powierzchnią jest depozycja na powierzchni implantu białek osocza, co w konsekwencji może powodować adhezję i aktywację płytek krwi. Przyleganie krwinek płytkowych do wielu biomateriałów jest mniejsze w porównaniu z przyleganiem do błony podstawnej naczyń i do kolagenu, ma jednak decydujące znaczenie w serii reakcji prowadzących do powstania skrzepu. Równocześnie obserwuje się adhezję leukocytów i erytrocytów do obcej powierzchni [1]. Stopień aktywacji płytek krwi [1] zależy od rodzaju zdeponowanego białka: fibrynogen aktywuje adhezję płytek, podczas gdy albuminy zapobiegają jej. Tak więc stosunek albumin do fibrynogenu zaadsorbowanego na biomateriale może być wskaźnikiem jego trombozgodności. Im mniejsza jest wartość tego wskaźnika, tym większą obserwuje się liczbę zaadherowanych płytek [2, 6, 7].

Aktywację płytek krwi można ocenić poprzez zmianę ich kształtu, formowanie pseudopodiów, zmiany chemiczne w błonie komórkowej, indukcje aktywności prokoagulatoryjnej, uwalnianie zawartości ziarnistości, inicjowanie agregacji oraz uwalnianie mikrocząstek lub małych pęcherzyków błonowych z ich powierzchni [8].

Stwierdzono, że materiały o dużej szorstkości powodują przyleganie i mogą indukować kontaktowe naprowadzanie komórek, dzięki czemu ułatwiony jest ich ruch po biomateriale na skutek reorganizacji cytoszkieletu [9].

Wykazano, że im bardziej zróżnicowana mikrostruktura powierzchni tym większa jest liczba zaadherowanych płytek krwi, wyższa ekspresja selektyny P i większa liczba tzw. mikrocząstek uwalnianych z krwinek płytkowych [8, 10].

1a). Larger microscopic magnifications show that platelets have long, numerous pseudopodia. Blood platelets adhere to a surface alone or form small groups consisting of 2-3 cells (FIG. 1b). Approximately there are 3,4 platelets on 1 mm^2 of a surface. And on NCD surface covering Ti6Al4V titanium alloy, after exposure to blood numerous platelets were observed distributed equally on the whole surface of samples. Sometimes leukocytes of 5 mm diameter were also visible (FIG. 1c). Platelets adhere alone and they have numerous, thin and long pseudopodia (FIG. 1d). It was calculated that for 1 mm^2 of surface of alloy covered with NDC approximately 2 platelets are adhered, which constitutes to app. 59% of the number of platelets observed on titanium alloy without NCD layer.

Contact of whole blood with surface of TiN and TiN+NCD

After exposure to whole blood numerous of leukocytes and small number of platelets were found on surface of titanium nitride (FIG. 2a). All the leukocytes have spherical shape and the same size - app. 5 mm diameter. Blood platelets are, however, heteromorphic and have different number of pseudopodia (FIG. 2b). Number of platelets for 100 mm^2 is 0.42. After titanium nitride was covered with NCD large number of leukocytes was found on the surface also, and they seem to be in tighter contact with the surface, because its observed formation of cytoplasmic processes by those cells. However, number of adhered platelets, decreases significantly, and for 100 mm^2 of surface there are app. 0.2, which constitutes 47% of the number of platelets observed on a surface of titanium nitride (FIG. 2c, d).

Discussion

First response of blood on contact with artificial surface is the deposition of plasma proteins, on implant surface. This causes adhesion and activation of blood platelets. Adhesion of blood platelets to many biomaterials is less comparing to the adhesion to basement membrane of vessels and to collagen. It has, however, significant an crucial for clot formation. At the same time adhesion of leukocytes and erythrocytes to foreign surface is observed [1]. Level of activation of platelets depends on a kind of deposited protein: fibrinogen activates platelets on the other hand, and albumines prevent it. Therefore, ratio of albumin to fibrinogen adsorbed on a biomaterial may be an indicator for its thrombocompatibility. The smaller the indicator, the largest number of adhered platelets is observed [2, 6, 7]. Activation of blood platelets may be assessed through the change of their shape, pseudopodia forming, chemical changes in cell membrane, induction of procoagulation activity, release of granules contents, initiation of aggregation and release of microparticles or small membrane vesicles from their surface [8].

It was found that materials of high roughness cause adherence and may induce contact direction of cells allowing them easier movement on biomaterial due to reorganization of cytoskeleton [9]. Showed that the more differentiated microstructure of a surface, the largest number of adhered platelets, higher expression of P-selectine and larger number of micro-particles released from blood platelets [8, 10].

Titanium and its alloys have excellent osteointegrative properties comparing to the other materials. Mechanism of this phenomenon is not known. In phase just after implantation there is an intensive binding of blood platelets, larger than the one observed for other biomaterials, and their activation is much larger, what is reflected by levels of β -

Tytan i jego stopy posiadają znakomite właściwości osteointegracyjne w porównaniu z innymi biomateriałami. Mechanizm tego zjawiska jest nieznan. W fazie tuż po implantacji następuje intensywne wiązanie płytek krwi, większe w porównaniu do innych biomateriałów a stan ich aktywacji znacznie większy, co odzwierciedla się poziomem b-tromboglobuliny i Płytkopochodny Czynniki Wzrostu (PDGF). Białka a-granul płytek krwi, i PDGF są znanymi potencjalnymi promotorami osteogenezy, co sugeruje, że zdecydowane trombogeniczne cechy tytanu mogą przyczynić się do dobrych właściwości osteointegracyjnych [11].

W organizmie białka odgrywają ważną rolę w modyfikowaniu i określaniu fizycznych i chemicznych właściwości powstających tkanek. Warstwa białek pokrywających implant może być głównym czynnikiem determinującym biogłówność implantu (12). Dlatego też komórki osteogeniczne nie wchodzi w interakcje z implantem ale ze zmodyfikowaną przez krew powierzchnią implantu (10, 13).

Istnieje wiele doniesień literaturowych, z których wynika, że warstwy węglowe zwiększają znacznie trombogłówność biomateriałów. Opisano w badaniach in vitro wzrost stosunku albumin do fibrynogenu na powierzchni DLC w porównaniu z powierzchnią azotku węgla (CN) i polimetylo-metakrylanu (PMMA) (14). Badania morfometryczne Jonesa i wsp. wykazały, że warstwa DLC na tytanie, TiN i TiC powoduje zmniejszenie obszaru powierzchni tego biomateriału zajętego przez płytki krwi (6, 7). Podobne efekty uzyskano nanosząc DLC na powierzchnię stentów ze stali medycznej. Dodatkowo wykazano, że warstwa węglowa redukuje uwalnianie jonów ze stali, co zwiększa jej biokompatybilność [15]. Pokrycie warstwą NCD powierzchni stopu tytanu Ti6Al4V i TiN w niniejszej pracy zredukowało znacznie trombogłówność tych materiałów. Pozostaje więc pytanie czy redukcja ta jest wystarczająca w zastosowaniach do kontaktu z krwią.

thromboglobulin and Platelet Derived Growth Factor (PDGF). Proteins of a-granules of blood platelets and PDGF are known potential promoters of osteogenesis which suggests that decides about their thrombogenic features of titanium might contribute to good osteointegrative features [11].

In organism proteins play significant role in modification and defining physical and chemical properties of formed tissues. A layer of proteins covering an implant may be the main factor determining biocompatibility of the implant (12). That's why osteogenic cells do not interact with an implant but with a surface of implant modified by blood [10,13].

There are many scientific reports in literature suggesting that carbonic layers significantly increase thrombocompatibility of biomaterials. Increase of ratio of albumin to fibrinogen ratio in vitro on surface of DLC comparing to carbon nitride (CN) and polymethylmethacrylate (PMMA) was described (14). Morphometric studies of Jones et al. [6,7] showed that DLC layer on titanium, TiN and TiC causes decrease of surface of biomaterials occupied by blood platelets. Similar effects were obtained applying DLC on surface of stents of medical steel. Additionally it was showed that carbonic layer reduces release of ions from steel, and therefore increases biocompatibility [15].

Covering Ti6Al4V and TiN titanium alloys with NCD layer within this study significantly reduced thrombogenicity of those materials. So, a question remains if this reduction is sufficient for usage in exposure to blood.

Acknowledgements

This work was partially supported by the KBN grants no. 7T08D 036 21 and PBZ KBN 082/T08/13

Piśmiennictwo

- [1] Głowiński St. Biomateriały w kontakcie z krwią. W: Nałęcz M.(red) Problemy Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej. T.4 Biomateriały. Wyd.Komunikacji i Łączności, Warszawa 1990:133-197.
- [2] Courtney J. M.,Lamba L.M., Sundaram S., Forbes C.D. Biomaterials for blood contacting applications. Biomaterials 15,1994,737-744
- [3] Bąkiewicz K., Mitura S.: Biocompatibility of NCD. J Wide Band gap Mat. 9,2002,261-271.
- [4] Mitura S., Niedzielski P., Jachowicz D., Langer M., Marciniak J., Stanishevsky A., Louda P., Tochisky E., Couvrat P., Denis m., Lourdin P.: Influence of carbon coatings origin on the properties for biomedical application. Diamond Relat. Mat. 5,1996,1185-1188.
- [5] Mitura S., Mitura A., Niedzielski P.,Couvrat P.: Nanocrystalline diamond coatings. In. S. Mitura (red.) Nanotechnology in Materials Science, Pergamon Press,Elsevier 2000,2165-2176.
- [6] Jones M.I., McColl I.R., Grant D.M., Parker K.G., Parker T.L.: Haemocompatibility of DLC and TiC-TiN interlayers on titanium. Diam. Rel. Mat. 8,1999,457-462.
- [7] Jones M.J., McCall J.R., Grant D.M., Parker K.G. Parker T.L.: Protein adsorption and platelet attachment and activation on TiN, TiC and DLC coating on titanium for cardiovascular applications. J Biomed. Mater. Res. 52, 2000, 413-431.

References

- [8] Park J.Y.,Gemmel H., Davies J.E.: Platelets interactions with titanium: modulation of platelet activity by surface topography. Biomaterials 20, 2001, 2671-2682.
- [9] Czyż J.: Zjawisko kontaktowego naprowadzania komórek. Post. Biol. Kom. 20(suppl), 1993,125-133.
- [10] Eisenbarth E., Meyle J., Nachtingall W., Breme J.: Influence of the surface structure of titanium materials on the adhesion fibroblast. Biomaterials 17, 1996, 1399-1403.
- [11] Hong J., Andersson J., Nilsson Ekdahl K., Elgue G., Axen N., Larsson R., Nilsson B.: Titanium is highly thrombogenic biomaterial: Possible implications for osteogenesis. Thromb. Homeost. 82, 1999, 58-64.
- [12] Zeng H., Chttur K.K., Laceyfield W.R.: Analysis of bovine serum albumin on calcium phosphate and titanium surfaces. Biomaterials 20, 1999, 377-384.
- [13] Park J.Y., Davies J.E.: Red blood cell and platelet interactions with titanium implant surfaces. Clin. Oral Implant Res. 11, 2001, 530-539.
- [14] Cui F.Z., Li D.J.: A review on investigations on biocompatibility of diamond-like carbon and carbon nitride films. Surf. Coat. Technol. 131, 2000, 4811-487.
- [15] Gutenssohn K., Beythien C., Bau J., Fenner T., Grewe P., Koester R., Padmanaban K., Kuehnl P.: In vitro analyses of diamond-like coated stents: Reduction of metal ion release, platelet activation and thrombogenicity. Thromb. Res. 99, 2000, 577-585.