

MARIA SZYMONOWICZ<sup>1, A-D</sup>, ZBIGNIEW RYBAK<sup>1, E, F</sup>, DANUTA PALUCH<sup>1, C</sup>,  
KRZYSZTOF MARYCZ<sup>2, B</sup>, KRZYSZTOF KALIŃSKI<sup>2, B</sup>, STANISŁAW BŁAŻEWICZ<sup>3, E, G</sup>

## Badania interakcji powierzchni węgla pirolitycznego z komórkami i białkami krwi

### Studies of Interaction Between Surface of Pyrolytic Carbon and Blood Cells and Proteins

<sup>1</sup> Zakład Chirurgii Eksperymentalnej i Badania Biomateriałów, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, Wrocław, Polska

<sup>2</sup> Pracownia Mikroskopii Elektronowej, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Wrocław, Polska

<sup>3</sup> Katedra Biomateriałów, Akademia Górniczo-Hutnicza w Krakowie, Kraków, Polska

A – koncepcja i projekt badania; B – gromadzenie i/lub zestawianie danych; C – analiza i interpretacja danych;  
D – napisanie artykułu; E – krytyczne zrecenzowanie artykułu; F – zatwierdzenie ostatecznej wersji artykułu;  
G – opracowanie składu węgla pirolitycznego

#### Streszczenie

**Wprowadzenie.** Zapobieganie i poznanie przyczyn tworzenia się zakrzepów krwi na powierzchni biomateriałów są głównym problemem przy opracowywaniu nowych materiałów przeznaczonych na wszczepy do układu krwionośnego. Interakcja między środowiskiem biologicznym a implantem węglowym jest ściśle związana z właściwościami jego powierzchni. Szczególne znaczenie dla medycyny mają implanty, których powierzchnia pokryta węglem pirolitycznym charakteryzuje się atrombogennością.

**Cel pracy.** Ocena wpływu powierzchni węgla pirolitycznego na aktywację krzepnięcia krwi.

**Materiał i metody.** Pełną krew ludzką poddano *in vitro* czasowemu kontaktowi z powierzchnią węgla izotropowego niskotemperaturowego (LTI). Działanie hemostatyczne węgla pirolitycznego określono, oznaczając wybrane wskaźniki osoczonego układu krzepnięcia oraz czas rekalcynacji na powierzchni materiału. Ocenę topografii materiału wykonano z użyciem elektronowego mikroskopu skaningowego.

**Wyniki.** W badaniach osoczonego układu krzepnięcia nie stwierdzono zmian w wartościach APTT, PT, TT, fibrynogenu oraz aktywności czynników F XII, F IX, F VIII, jak i AT III, białka C i plazminogenu. Czas krzepnięcia krwi na powierzchni materiału był wydłużony w porównaniu do powierzchni szkła oraz polistyrenowej.

**Wnioski.** Bezpośredni kontakt krwi z powierzchnią węgla LTI wydłuża formowanie skrzepu, nie zmieniając jednocześnie wskaźników osoczonego układu krzepnięcia w czasowym kontakcie (**Polim. Med. 2013, 43, 3, 165–173**).

**Słowa kluczowe:** biomateriały, węgiel pirolityczny, układ krzepnięcia, układ fibrynolityczny, inhibitory krzepnięcia, czas rekalcynacji, adhezja krwinek płytkowych, elektronowy mikroskop skaningowy.

#### Abstract

**Background.** Preventing blood clots formation on the biomaterials surface and finding the causes of their appearance are the leading research subjects while working out biomaterials for grafts into the circulation system. Interaction between the biological environment and the carbon implant is closely connected with the properties of its surface. Implants with surfaces covered with pyrolytic carbon is characterised by athrombogenicity have particular significance in medical applications.

**Objectives.** Assessment of the influence of a pyrolytic carbon surface on the activation of coagulation system.

**Material and Methods.** Full human blood was subjected to temporal contact *in vitro* with the surface of low-temperature isotropic carbon (LTI). The haemostatic action of pyrolytic carbon was determined through marking the chosen parameters

\* Praca została wykonana w ramach projektu badawczego nr 1821 Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu.

of the coagulation system and the recalcification time on the material surface. The evaluation of the topography of the material was performed in the scanning microscopy.

**Results.** Changes in the values APTT, PT, TT, fibrinogen and activity of factors F XII, F IX, F VIII as well as AT III, protein C and plasminogen were not observed in the studies of the plasmatic coagulation system. The blood coagulation time on the material surface was elongated in comparison with the surface of glass and polystyrene surface.

**Conclusions.** Direct contact of blood with the surface of carbon LTI elongates clot formation, while not changing the parameters of the plasmatic coagulation system in temporal contact (*Polim. Med.* 2013, 43, 3, 165–173).

**Key words:** biomaterials, pyrolytic carbon, coagulation system, fibrinolytic system, coagulation inhibitors, recalcification time, platelet adhesion, scanning microscopy.

Rozwój biomateriałów stosowanych w kardiochirurgii, a w szczególności materiałów konstrukcyjnych przeznaczonych do implantacji w chirurgii naczyniowej jest uwarunkowany rozwojem wiedzy na temat wpływu właściwości fizykochemicznych powierzchni oraz składu chemicznego materiału na procesy biologiczne zachodzące we krwi. Powinny one być biozgodne i nie wywoływać żadnych zmian w środowisku, w którym się znajdują [1].

Implanty zawsze w jakimś stopniu ulegają interakcji ze składnikami morfotycznymi krwi i oddziałują na jej krzepnięcie [2]. Materiały węglowe o strukturze grafitu są uważane za materiały atrombogenne, czyli niepowodujące powstawania zakrzepów w kontakcie z krwią, aktualny stan wiedzy dotyczący możliwości ich szerszego wykorzystania w kardiochirurgii jest jednak niewystarczający, stąd też prowadzi się intensywne badania w tym obszarze. Obecnie, oprócz naturalnych form węgla, są jeszcze inne wytworzone laboratoryjnie. Sposób wytwarzania węgla w postaci powłoki ma zasadniczy wpływ na jego właściwości użytkowe [3].

W odniesieniu do zastosowań medycznych szczególne znaczenie mają implanty, których powierzchnia jest pokryta węglem pirolitycznym. Główną zaletą materiałów węglowych otrzymanych na drodze pirolizy jest możliwość kształtowania pożądanych właściwości przez odpowiedni dobór parametrów procesu technologicznego, bez konieczności wprowadzania dodatków modyfikujących. Odpowiedź układu naczyniowego na wszczepiony biomateriał jest zasadniczo podyktowana jego właściwościami powierzchniowymi. Pokrycie implantów warstwą węgla pirolitycznego powoduje z jednej strony zwiększenie wymagań stawianych tego typu materiałom, z drugiej poszukiwanie nowych metod technologii poprawiających ich właściwości użytkowe. Warstwy węgla pirolitycznego można otrzymać w różnych modyfikacjach, zwiększa to ich możliwości w zastosowaniu w medycynie [4–6].

Celem pracy była ocena wpływu powierzchni węgla pirolitycznego na aktywację krzepnięcia krwi oraz adhezję składników morfotycznych krwi w badaniach *in vitro*.

## Materiał i metody

Badaniom poddano niskotemperaturowy pirolityczny węgiel izotropowy, LTI (*low temperature isotropic carbon*) w postaci warstwy otrzymanej na podłożu

z grafitu syntetycznego. Próbkę pokrytą warstwą węgla LTI otrzymano techniką CVD (*Chemical Vapour Deposition*) w Katedrze Biomateriałów Wydziału Inżynierii Materiałowej i Ceramiki AGH w Krakowie. Poddano je sterylizacji radiacyjnej dawką 25 kGy. Badania aktywacji krzepnięcia krwi po czasowym kontakcie próbek węgla LTI z pełną krwią cytrynianową wykonano w Zakładzie Chirurgii Eksperymentalnej i Badania Biomateriałów UM we Wrocławiu.

Badania wykonano na bezimiennej krwi ludzkiej grupy 0Rh+ pobranej do pojemnika plastikowego z jałowym, apyrogennym płynem konserwującym CPD [7, 8]. Krew pełną konserwowaną (KPK) otrzymano z Centrum Krwiodawstwa we Wrocławiu. Na badania uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej we Wrocławiu (nr KB-588/2008).

Pełną krew ludzką wraz z próbką węgla LTI oraz bez materiału (kontrola) inkubowano przez 15, 30, 60, 120 min w temperaturze pokojowej. Po wyjęciu próbki krew wirowano ( $1467 \times q \times 10$  min) i oddzielono osocze od masy elementów morfotycznych krwi [9–13].

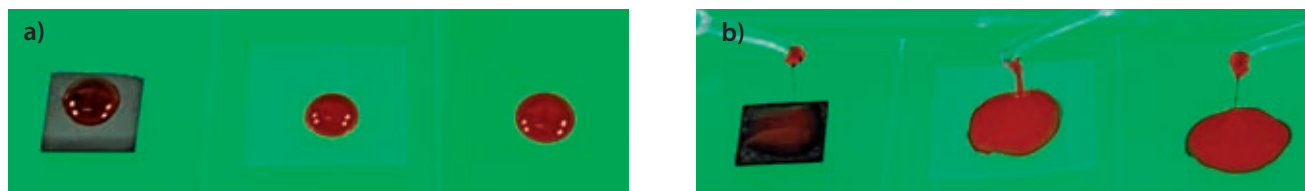
W osoczu oznaczono czas częściowej trombolastyiny po aktywacji (APTT) i czas protrombinowy (PT), dla którego określono wskaźnik protrombinowy (PT%) oraz współczynnik protrombinowy (INR). Oznaczono również czas trombinowy (TT), stężenie fibrynogenu (FB), aktywność antytrombiny III (ATIII) i białka C (Prot C) oraz plazminogen (Plg) i aktywność czynników: XII (FXII), IX (FIX) i VIII (FVIII). Badania przeprowadzono na analizatorze BCT Dade Behring [10–13].

Badania krzepnięcia pełnej krwi wykonano, mierząc czas rekalcynacji na powierzchni i po pełnym zarzuceniu materiału we krwi.

Na powierzchnię próbek węgla LTI (2 cm<sup>2</sup>) nanesiono pełną krew (0,02 cm<sup>3</sup>) i oceniono jej kształt. Po dodaniu 25 mmol/l chlorku wapniowego (0,02 cm<sup>3</sup>) obserwowano proces formowania się skrzepu. Analogicznie wykonano badania na powierzchni polistyrenowej i szklanej – próby kontrolne (ryc. 1) [14–16].

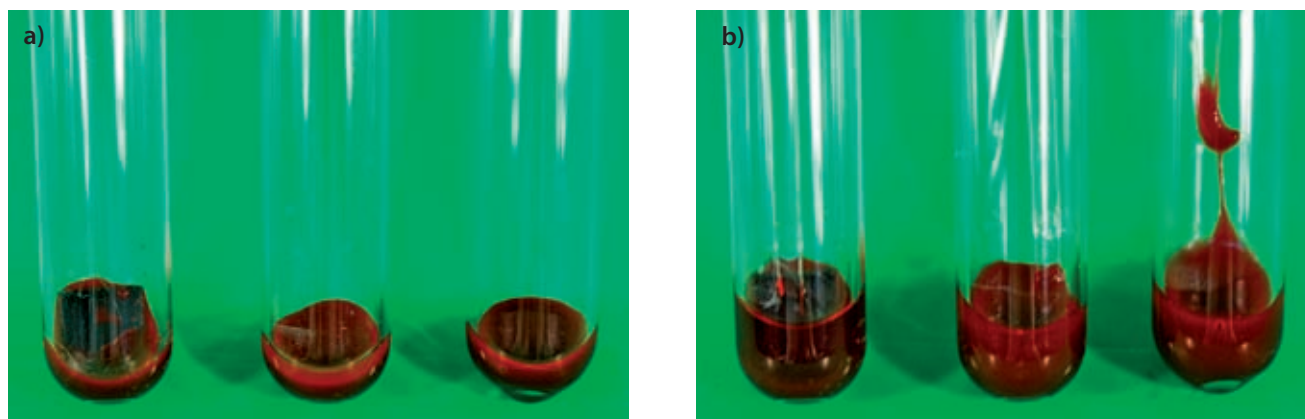
Do próbek węgla LTI o całkowitej powierzchni 1,5 cm<sup>2</sup> dodano pełną krew (0,5 cm<sup>3</sup>) i inkubowano (2 h/37°C). Następnie po dodaniu 25 mmol/l chlorku wapnia (0,5 cm<sup>3</sup>) zmierzono czas krzepnięcia krwi. Równolegle wykonano pomiary czasów rekalcynacji dla powierzchni polistyrenowej i szklanej (ryc. 2–3) [14–16].

Badanie przeprowadzono na osoczu bogatopłytkowym otrzymanym z krwi kontrolnej oraz krwi po kon-



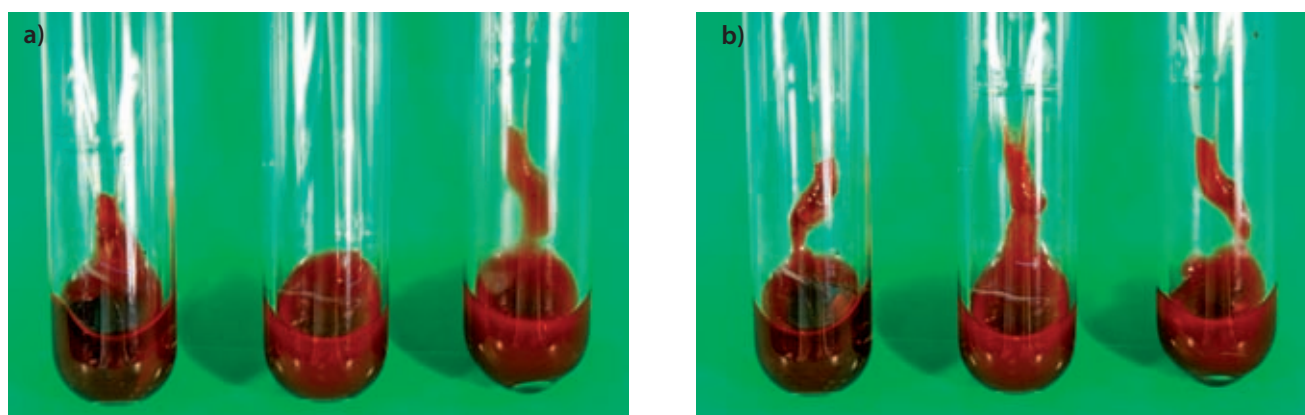
**Ryc. 1.** Krew cytrynianowa na powierzchni. Od lewej: węgla LTI, polistyrenowej i szklanej. Pomiar czasu rekalcynacji. Wyciągnięta nitka fibrynowa skrzepu

**Fig. 1.** Blood citrate on the surface. From left: LTI carbon, polystyrene and glass. The measurement of recalcification time. Pulled thread fibrin of blood clot



**Ryc. 2.** Pomiar czasu rekalcynacji. Krew cytrynianowa. Od lewej: z węglem LTI, w polistyrenie i w szkle, po prawej po dodaniu chlorku wapnia wyciągnięta nitka fibrynowa skrzepu krwi w szkle

**Ryc. 2.** Measurement of recalcification time. Citrated blood. From left: LTI carbon, in polystyrene and glass, from right after the addition of calcium chloride pulled fibrin thread of blood clot in glass



**Ryc. 3.** Pomiar czasu rekalcynacji. Wyciągnięta nitka fibrynowa skrzepu krwi, w kolejności: w szkle (po prawej), z węglem LTI (po lewej) oraz w polistyrenie (w środku)

**Fig. 3.** Measurement recalcification time. Pulled fibrin thread of blood clot in turn: in glass (right), with coal LTI (left) and in polystyrene (center)

także z węglem LTI przez 15 i 30 min w temperaturze pokojowej. Pomiar agregacji krwinek płytkowych wykonano metodą fotometryczną z użyciem agregometru typ APACT/Labor. Jako czynnik agregujący zastosowano roztwór ADP.

Próbki węgla LTI, szkła (szkiełka nakrywkowe mikroskopowe) i polistyrenowe inkubowano przez 30 min z krwią cytrynianową. Po płukaniu w buforze fosfora-

nowym o pH = 7,6 próbki utrwalono w 2,5% aldehydzie glutarowym i odwodniono w zwiększającym się stężeniu acetonu (od 30% do 100%). Po wysuszeniu próbki umieszczono na stoliku pomiarowym i napyłono złotem. Obserwację powierzchni materiałów wykonano przy powiększeniu 3 00 KX i 5 00 KX z zastosowaniem elektronowego mikroskopu skaningowego Zeiss EVO® LS 15 w Pracowni Mikroskopii Elektronowej Uniwer-

sytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Obrazy dokumentowano fotograficznie [17].

Wyniki badań poddano analizie statystycznej z użyciem programu statystycznego Statistica 6.02. Obliczono średnią arytmetyczną ( $\bar{X}$ ), odchylenie standardowe ( $\pm$  SD), poziom istotności ( $p$ ) oraz zakres wartości (min.–maks.). Istotne różnice w średnich wartościach określono testem T dla prób niezależnych. Przyjęto, że współczynniki korelacji są istotne przy  $p < 0,05$ .

## Wyniki

Średnie wartości wskaźników osoczkowego układu krzepnięcia wraz z odchyleniem standardowym ( $\pm$  SD) dla krwi kontrolnej oraz po inkubacji z węglem LTI w temperaturze pokojowej przez 15, 30, 60, 120 min przedstawiono w tabelach 1–3 [18].

Wartości APTT, aktywność czynnika XII i czynnika IX (tab. 1), wartości PT, PT %, PT INR, TT i stęże-

**Tabela 1.** Czas częściowej tromboplastyny po aktywacji (APTT), aktywność czynnika XII (FXII), czynnika IX (FIX) i czynnika VIII (FVIII) we krwi kontrolnej oraz po kontakcie z węglem LTI w temperaturze pokojowej

**Table 1.** Activated partial thromboplastin time (APTT), factor XII (FXII), factor IX (FIX) and factor VIII (FVIII) activity in the control blood and after contact with the carbon LTI at room temperature

Materiał (Material)	Czas (Time) (min)	APTT (s)	FXII (% aktyw.)	FIX (% aktyw.)	FVIII (% aktyw.)
Węgiel LTI	15	31,45 $\pm$ 0,28	117,00 $\pm$ 1,29	114,50 $\pm$ 3,50	99,00 $\pm$ 4,20
	30	31,42 $\pm$ 0,34	118,50 $\pm$ 1,29	107,50 $\pm$ 2,53	99,86 $\pm$ 4,54
	60	31,52 $\pm$ 0,23	118,75 $\pm$ 1,00	104,33 $\pm$ 3,24	84,66 $\pm$ 2,08
	90	30,77 $\pm$ 0,22	120,25 $\pm$ 1,25	102,50 $\pm$ 3,53	84,33 $\pm$ 2,51
	120	30,85 $\pm$ 0,18	120,50 $\pm$ 1,29	104,50 $\pm$ 2,50	87,00 $\pm$ 2,41
Kontrola	0	31,05 $\pm$ 0,32	118,0 $\pm$ 1,53	109,33 $\pm$ 3,51	98,33 $\pm$ 4,04
	15	31,10 $\pm$ 0,47	117,00 $\pm$ 1,21	111,00 $\pm$ 2,11	98,20 $\pm$ 4,01
	30	30,95 $\pm$ 0,34	118,50 $\pm$ 1,32	109,0 $\pm$ 3,78	96,66 $\pm$ 5,29
	60	32,00 $\pm$ 0,34	119,50 $\pm$ 1,50	102,33 $\pm$ 3,51	85,66 $\pm$ 2,08
	90	31,10 $\pm$ 0,25	122,50 $\pm$ 1,53	107,50 $\pm$ 3,51	86,16 $\pm$ 3,68
	120	31,05 $\pm$ 0,36	122,70 $\pm$ 1,87	104,00 $\pm$ 2,82	87,50 $\pm$ 2,12

Min.–maks.: APTT: 30,80 s – 31,50 s; F XII: 117,00–120,00% aktywności; F IX: 106,00–113,00% aktywności; F VIII: 94,00 – 102,00.

Min.–max: APTT: 30,80 s – 31,50 s; F XII: 117,00–120,00% activity; F IX: 106,00–113,00% activity; F VIII: 94,00 – 102,00.

**Tabela 2.** Czas protrombinowy (PT), czas trombinowy (TT) oraz stężenie fibrynogenu (Fb) we krwi kontrolnej oraz po kontakcie z węglem LTI w temperaturze pokojowej

**Table 2.** Prothrombin time (PT), thrombin time (TT) and fibrinogen concentration (Fb) in the control blood and after contact with the carbon LTI at room temperature

Materiał (Material)	Czas (Time) (min)	PT (s)	PT (%)	PT INR	TT (s)	Fb (g/l)
Węgiel (Carbon) LTI	15	10,16 $\pm$ 0,12	111,33 $\pm$ 0,55	0,905 $\pm$ 0,020	18,50 $\pm$ 0,70	3,53 $\pm$ 0,08
	30	10,18 $\pm$ 0,08	110,24 $\pm$ 0,56	0,905 $\pm$ 0,007	18,20 $\pm$ 0,30	3,57 $\pm$ 0,07
	60	9,98 $\pm$ 0,10	114,47 $\pm$ 0,96	0,865 $\pm$ 0,007	17,63 $\pm$ 0,35	3,68 $\pm$ 0,06
	90	10,20 $\pm$ 0,13	109,57 $\pm$ 0,53	0,910 $\pm$ 0,007	16,41 $\pm$ 0,37	3,71 $\pm$ 0,03
	120	9,96 $\pm$ 0,08	114,65 $\pm$ 0,92	0,850 $\pm$ 0,07	17,53 $\pm$ 0,55	3,65 $\pm$ 0,05
Kontrola (Control)	0	10,03 $\pm$ 0,10	111,38 $\pm$ 0,60	0,893 $\pm$ 0,005	17,53 $\pm$ 0,36	3,63 $\pm$ 0,06
	15	10,15 $\pm$ 0,06	111,20 $\pm$ 0,47	0,863 $\pm$ 0,055	17,31 $\pm$ 0,44	3,52 $\pm$ 0,07
	30	10,02 $\pm$ 0,05	112,85 $\pm$ 0,81	0,885 $\pm$ 0,007	17,10 $\pm$ 0,40	3,50 $\pm$ 0,07
	60	9,98 $\pm$ 0,10	114,33 $\pm$ 0,98	0,875 $\pm$ 0,007	16,96 $\pm$ 0,32	3,64 $\pm$ 0,04
	90	10,09 $\pm$ 0,10	114,32 $\pm$ 0,07	0,890 $\pm$ 0,007	17,06 $\pm$ 0,41	3,78 $\pm$ 0,07
	120	9,92 $\pm$ 0,09	113,07 $\pm$ 1,51	0,850 $\pm$ 0,020	17,26 $\pm$ 0,36	3,56 $\pm$ 0,06

Min.–maks.: PT: 9,90 s – 10,10 s; PT%: 111,85 s – 120,00 s; TT: 17,20 s – 17,90 s; Fb: 3,60 – 3,66 g/l.

Min.–max.: PT: 9,90 s – 10,10 s; PT%: 111,85 s – 120,00 s; TT: 17,20 s – 17,90 s; Fb: 3,60 – 3,66 g/l.



**Tabela 3.** Aktywność antytrombiny III (ATIII), białka C (Prot C) oraz plazminogenu (Plg) we krwi kontrolnej oraz po kontakcie z węglem LTI w temperaturze pokojowej**Table 3.** Antithrombin III (ATIII), protein C (Prot C) and plasminogen (Plg) activity in the control blood and after contact with carbon LTI at room temperature

Materiał (Material)	Czas (Time) (min)	ATIII (% aktyw.)	Prot C (% aktyw.)	Plg (% aktyw.)
Węgiel LTI	15	120,20 ± 1,31	97,22 ± 1,56	121,50 ± 0,50
	30	121,16 ± 0,65	96,70 ± 0,96	120,50 ± 0,61
	60	121,74 ± 0,48	96,69 ± 1,30	125,00 ± 1,00
	90	123,02 ± 0,43	98,75 ± 0,69	123,66 ± 0,57
	120	123,14 ± 0,54	103,14 ± 1,14	123,16 ± 1,26
Kontrola	0	122,10 ± 0,85	100,27 ± 1,16	121,33 ± 1,52
	15	120,14 ± 0,65	99,42 ± 1,02	121,00 ± 1,00
	30	121,32 ± 0,64	95,13 ± 3,09	119,16 ± 1,05
	60	122,44 ± 1,23	98,38 ± 1,13	123,66 ± 2,08
	90	123,08 ± 1,31	100,56 ± 0,41	125,37 ± 2,51
	120	124,53 ± 1,40	101,55 ± 0,77	123,50 ± 0,50

Min–maks: AT III: 121,10 – 121,30 % aktywności; Prot C: 100,45 – 102,10 % aktywności; Plg: 120 – 123,00 % aktywności.

Min.–max: AT III: 121,10 – 121,30 % activity; Prot C: 100,45 – 102,10 % activity; Plg: 120 – 123,00 % activity.

**Tabela 4.** Czas rekalcynacji pełnej krwi na powierzchni węgla LTI, polistyrenu (PP) i szkła**Table 4.** Recalcification time of whole blood on the surface carbon LTI, polystyrene (PP) and glass

Materiał (Material)	Czas rekalcynacji (Recalcification time) (s)	Wydłużenie czasu rekalcynacji w stosunku do kontroli (Prolongation recalcification time relative to control)	
		PS (%)	szkło (glass) (%)
Węgiel LTI (LTI carbon)	395 ± 10,70 * #	20	72
Kontrola (Control): szkło (glass)	229 ± 8,42	–	–
polistyren (polystyrene)	329 ± 10,38	–	–

\* p < 0,001 – różnica istotna w porównaniu z kontrolą – szkło.

# p < 0,001 – różnica istotna w porównaniu z kontrolą – PS.

\* p < 0,001 – differences in relation to the control – glass.

# p < 0,001 – differences in relation to the control – PS.

nie fibrynogenu (tab. 2) oraz aktywność antytrombiny III, białka C oraz plazminogenu (tab. 3) w osoczu po kontakcie z węglem LTI we wszystkich czasach badania nie różniły się istotnie (p > 0,05) od wartości tych parametrów w osoczu kontrolnym. Wartości były między sobą porównywalne i zbliżone do wartości wyjściowych, czasu 0.

Intensywność agregacji krwinek płytkowych osocza po 15, 30 min kontaktu z węglem pirolitycznym była

**Tabela 5.** Czas rekalcynacji pełnej krwi po zanurzeniu w niej węgla LTI**Table 5.** Recalcification time of whole blood after immersion of the carbon LTI

Materiał (Material)	Czas rekalcynacji (Recalcification time) (s)	Czas rekalcynacji w stosunku do kontroli (Recalcification time relative to control)	
		skrócony (shortened)	wydłużony (elongate)
		PS (%)	szkło (glass) (%)
Węgiel LTI (LTI carbon)	239 ± 16,39* #	17	15
Kontrola (Control): szkło (glass)	207 ± 14,67	–	–
polistyren (polystyrene)	290 ± 17,50	–	–

\* p < 0,05 – różnica istotna w porównaniu z kontrolą – szkło;

# p < 0,05 – różnica istotna w porównaniu z kontrolą – PS.

\* p < 0,05 – differences in relation to the control – glass.

# p < 0,05 – differences in relation to the control – PS.

porównywalna z wartościami stwierdzonymi w grupie kontrolnej. Spontaniczna agregacja zarówno w osoczu badanym oraz kontrolnym nie przekroczyła wartości 10%. Po dodaniu induktora (ADP), wielkość wychyleń krzywej agregacji dla osocza kontrolnego i badanego była w zakresie 82–94%.

Średnie wartości czasów rekalcynacji krwi wraz z odchyleniami standardowymi oraz poziom istotności podano w tabelach 4 i 5.

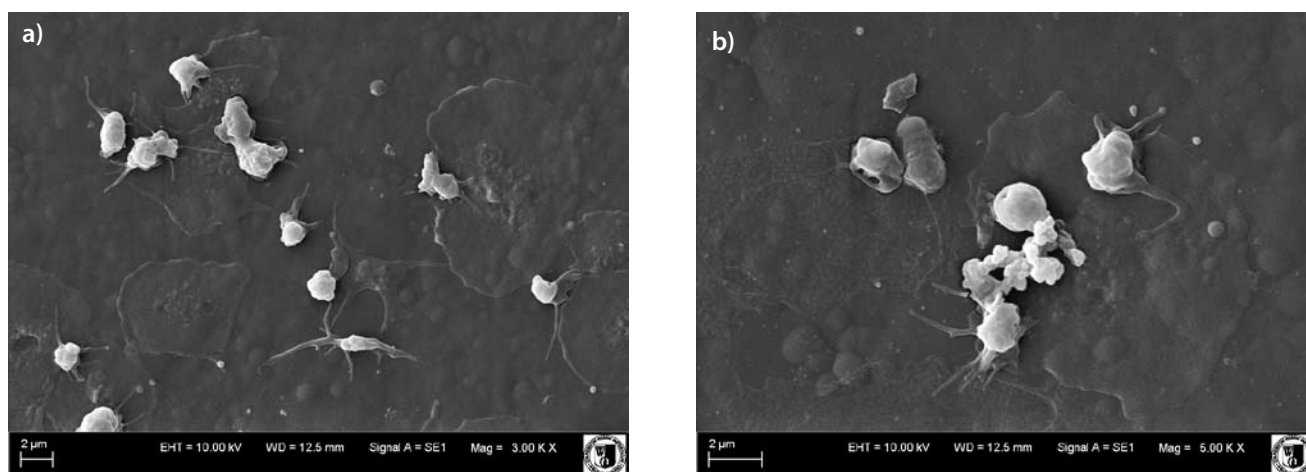
Na powierzchni węgla LTI i polistyrenowej krew miała kształt kulisty, a na powierzchni szklanej była rozplaszczona (ryc. 1). Czas krzepnięcia krwi po uwapnieniu mierzony na powierzchni LTI był istotnie wydłużony średnio o 152% ( $p < 0,001$ ) w porównaniu z powierzchnią szklaną, a o 15% ( $p < 0,01$ ) w porównaniu z powierzchnią polistyrenową (tab. 4).

Proces formowania skrzepu w próbówce, po pełnym zanurzeniu w niej węgla LTI i dodaniu jonów wapnia porównano do czasu rekalcynacji krwi w próbówce polistyrenowej i szklanej (tab. 5). Czas rekalcynacji krwi z węglem LTI był istotnie skrócony średnio o 17% ( $p < 0,05$ ) w porównaniu do powierzchni polistyrenowej

wej próbówki, a wydłużony średnio o 15% ( $p < 0,05$ ) w porównaniu do powierzchni szklanej (tab. 5).

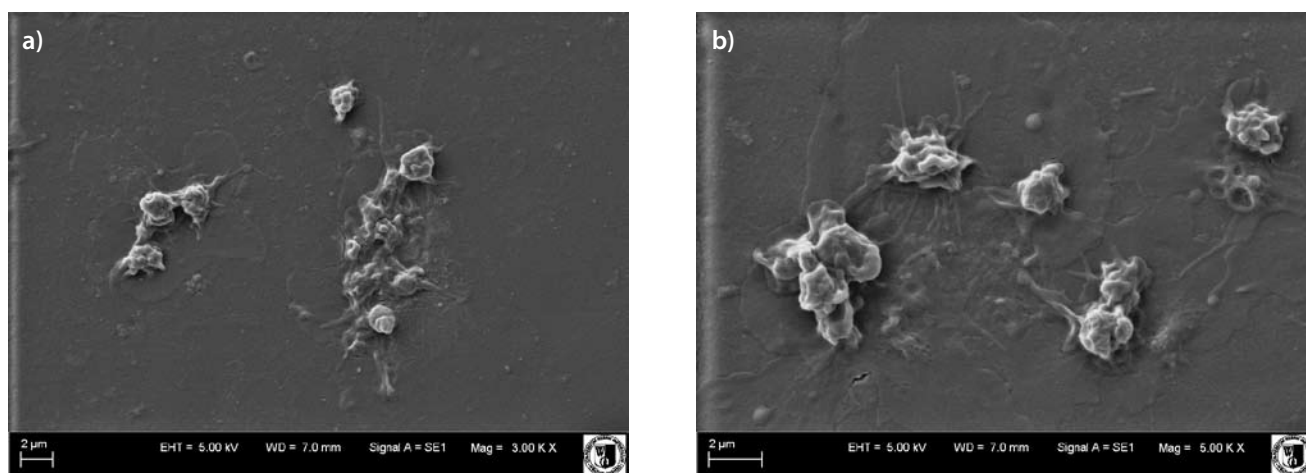
Ocenę morfologiczną krwinek czerwonych, krwinek białych i krwinek płytkowych dokonano na podstawie badań w elektronowym mikroskopie skaningowym (SEM). Obrazy powierzchni węgla LTI, szklanej i polistyrenowej podano na ryc. 4–6.

Powierzchnia węgla LTI charakteryzowała się wypukłościami różnej wielkości. Po kontakcie z krwią cytrynianową stwierdzono na powierzchni materiału krwinki płytkowe kształtu kulistego z pseudopodiami. Przylegały one do powierzchni pojedynczo oraz w postaci mniejszych i większych agregatów. Połączone ze sobą były krótkimi pseudopodiami i białkami osocza, co dawało efekt unoszenia się krwinek płytkowych nad powierzchnią (ryc. 4). Przy powierzchni stwierdzono granulocyty i sporadycznie erytrocyty o prawidłowych



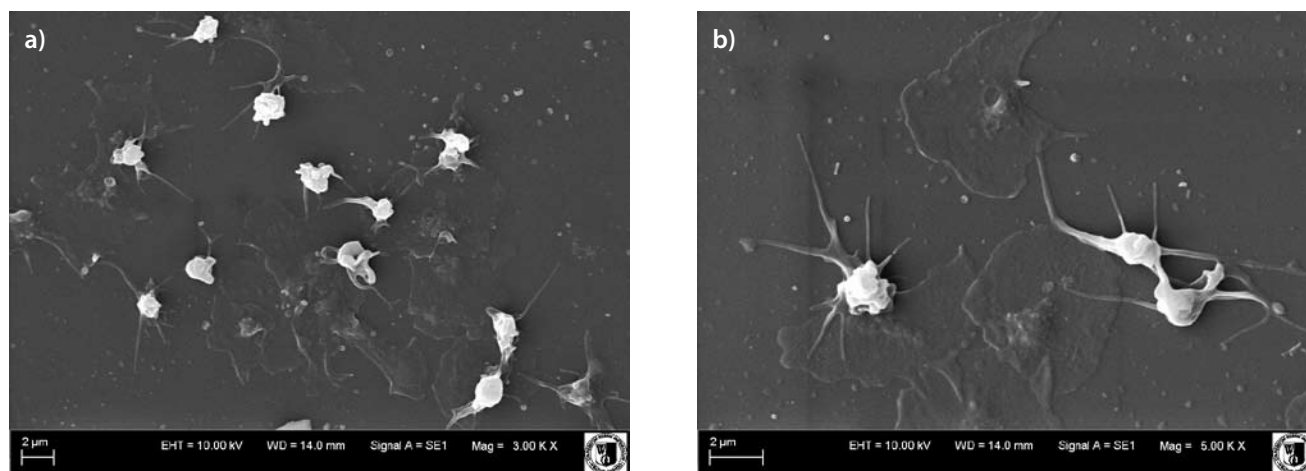
Ryc. 4. Obraz powierzchni węgla LTI po 30 min kontaktu z pełną krwią: a) SEM, pow. 3000×, b) SEM, pow. 5000×. Widoczne krwinki płytkowe z krótkimi pseudopodiami

Fig. 4. Image of carbon LTI surface after contact with whole blood for 30 min.: a) SEM, Magn. 3000×, b) SEM, Magn. 5000×. Platelets with short pseudopodia



Rys. 5. Obraz powierzchni polistyrenowej po 30 min kontaktu z pełną krwią: a) SEM, pow. 3000×, b) SEM, pow. 5000×. Widoczne krwinki płytkowe o nieregularnych kształtach z krótkimi pseudopodiami

Fig 5. Image of polystyrene surface after contact with whole blood for 30 min.: a) SEM, Magn. 3000×, b) SEM, Magn. 5000×. Platelets with irregular shapes and short pseudopodia



**Rys. 6.** Obraz powierzchni szkła po 30 min kontaktu z pełną krwią: a) SEM, pow. 3000×, b) SEM, pow. 5000×. Krwinki płytkowe o nieregularnych kształtach i długich pseudopodiach

**Fig. 6.** Image of glass surface after contact with whole blood for 30 min.: a) SEM, Magn. 3000×, b) SEM, Magn. 5000×. Platelets with irregular shapes and long pseudopodia

kształtach. Na powierzchni polistyrenowej krwinki płytkowe miały znacznie krótsze pseudopodia i bardziej zwartą strukturę (ryc. 5). Topografia powierzchni szklanej po kontakcie z krwią swoim wyglądem różniła się istotnie od powierzchni węgla LTI i polistyrenowej. Na powierzchni szklanej stwierdzono znaczną liczbę krwinek płytkowych, które miały postać pełzakowatą z długimi wypustkami cytoplazmatycznymi.

## Omówienie

Hemogodność materiałów syntetycznych, a zwłaszcza ich atrombogenność, są właściwościami, które mają wpływ na ich przydatność do zastosowań w kardiochirurgii i chirurgii naczyniowej. Wprowadzenie do krwiobiegu materiału polimerowego może być przyczyną zaburzeń w układzie hemostatycznym krwi. Mechanizm wykrzepiania zależy zarówno od krwi, składu chemicznego implantu, jak i właściwości fizykochemicznych powierzchni materiału. Zaburzenie równowagi hemostazy, układu prokoagulacyjnego, procesu tworzenia czopu włóknikowego oraz układu antykoagulacyjnego, zapewniającego płynność krwi, prowadzi do tworzenia zakrzepów i może być źródłem powikłań zakrzepowo-zatorowych.

Właściwości powierzchniowe materiału, takie jak: zwilżalność, zdolność do powstawania statycznego ładunku powierzchniowego, stan chemiczny i fizyczny powierzchni czy potencjał zeta mogą w tym mechanizmie odgrywać istotną rolę. Nawrot et al. [2], Błażewicz et al. [4], Mania et al. [5] uważają, że kryteria wynikające jedynie ze stanu powierzchni nie są wystarczające w projektowaniu implantów dla kardiochirurgii. Fogler et al. [3] opisali procesy interakcji materiału z białkami, płytkami krwi oraz składnikami krzepnięcia, które powinny być uwzględniane przy projektowaniu biomateriałów. Seifert et al. [9] oraz wytyczne w PN-EN-ISO [10, 11] podają, że badania aktywacji krzepnięcia są niezbędne przy dopuszczeniu ma-

teriałów do kontaktu z krwią do zastosowań w chirurgii regeneracyjnej i rekonstrukcyjnej. Zwiększenie wymagań stawianych tym materiałom przyczynia się do rozwoju i opracowania technologii modyfikacji powierzchni nowych materiałów oraz metod ich oceny.

Przeprowadzone badania miały na celu określenie oddziaływania powierzchni węgla pirolitycznego LTI na aktywację układu krzepnięcia w badaniach *in vitro*.

Aktywację krzepnięcia krwi określono, badając osoczowy układ krzepnięcia, oznaczając czasy krzepnięcia po uwapnieniu (rekalcynacji) na powierzchni węgla LTI i po jego pełnym zanurzeniu we krwi, a także oceniając topografię powierzchni materiału.

Podczas oceny osoczowego układu krzepnięcia nie stwierdzono istotnych zmian w wartościach czasów krzepnięcia (APTT, PT, TT) oraz aktywności czynników XII, IX i VIII. Wartości pomiarowe były porównywalne i zbliżone do kontroli. Aktywność naturalnych inhibitorów (ATIII, Prot C) oraz stężenie fibrynogenu było niezmienione. Aktywność plazminogenu charakteryzująca układ fibrynolityczny mieściła się zakresie wartości kontrolnej. Samoistna agregacja krwinek płytkowych oraz po dodaniu czynnika agregującego była prawidłowa. Świadczy to o tym, że kontakt materiału z krwią nie zaburzył funkcji czynnościowych płytek krwi. Szelest-Lewandowska et al. [13] uzyskała podobne wyniki przy ocenie poliuretanów, materiałów przeznaczonych na implanty w kardiochirurgii oraz Paluch et al. [17, 19] protez naczyniowych o hydrofobowej zwilżalności powierzchni.

W badaniach krzepnięcia krwi na powierzchni węgla LTI stwierdzono, że jego powierzchnia wykazuje właściwości hydrofobowe, co mogło wpłynąć na wydłużenie procesu formowania się skrzepu. Jednocześnie w badaniach krzepnięcia krwi po zanurzeniu w niej materiału stwierdzono skrócenie tego procesu. Najprawdopodobniej jest to związane z topografią powierzch-

ni materiału z jego nierównościami, a tym samym ze zwiększoną adhezją krwinek płytkowych do jej powierzchni. Szymonowicz et al. [20] w badaniach wskaźników morfologicznych krwi wykazali, że liczba krwinek płytkowych zmniejszyła się we krwi po czasowym jej kontakcie z powierzchnią węgla LTI. W badaniach biomateriałów Paluch et al. [17, 19], Koha et al. [21] oraz Sobolewska et al. [22] wykazali, że topografia powierzchni materiałów i zwilżalność mają istotny wpływ na aktywność krwinek płytkowych oraz na stopień ich adsorpcji i agregacji na powierzchni materiału.

Podsumowując, należy stwierdzić, że warstwa pirolitycznego węgla LTI w kontakcie z pełną krwią nie zmienia istotnie wartości parametrów osocznego układu krzepnięcia; wykazuje właściwości hydrofobowe, wydłużając proces aktywacji krzepnięcia na swojej powierzchni. Analiza mikroskopowa topografii powierzchni węgla pirolitycznego wykazała jej nierówności – niezbędne są zatem dalsze prace nad opracowaniem materiału o jednorodnej powierzchni.

## Piśmiennictwo

- [1] Pielka S., Paluch D., Staniszevska-Kuś J., Solski L.: Badania biogodności materiałów implantacyjnych. [W:] Biocybernetyka i inżynieria biomedyczna 2000. Red.: Nałęcz M. Akademicka Oficyna Wydawnicza, Warszawa 2003, 425–497.
- [2] Nawrot Z.: Biomateriały w kardiologii. [W:] Biocybernetyka i inżynieria biomedyczna 2000. Red.: Nałęcz M. Akademicka Oficyna Wydawnicza, Warszawa 2003, 530–581.
- [3] Vogler E.A., Siedlecki Ch.A.: Contact activation of blood-plasma coagulation. *Biomater.* 2009, 30, 1857–1809.
- [4] Błazewicz S., Chłopek J., Błazewicz M.: Biomateriały węglowe i kompozytowe. [W:] Biocybernetyka i inżynieria biomedyczna 2000. Red.: Nałęcz M. Akademicka Oficyna Wydawnicza, Warszawa 2003, 332–423.
- [5] Mania R., Obłąkowska D., Błazewicz S.: Carbon coatings for cardiosurgery – preliminary results. *Eng. Biomater.* 2001, 4, 17–19, 42–44.
- [6] Gutensohn K., Beythien C., Bau J., Fenner F., Greve P., Koester R., Padmannaban K., Kuehn P.: *In vitro* analyses of Diamond – like Carbon Coated Stents: Reduction of Metal Ion Release, Platelet activation, and Thrombogenicity. *Thromb. Res.* 2000, 99, 577–585.
- [7] Rosiek A.: Pobieranie krwi i zabiegi aferezy. [W:] Medyczne zasady pobierania krwi, oddzielania jej składników i wydawania, obowiązujące w jednostkach organizacyjnych publicznej służby krwi. Red.: Łętowska M. Instytut Hematologii i Transfuzjologii, Warszawa 2006, 91–100.
- [8] Antoniewicz-Papis J., Dziwiątkowska A.: Preparatyka krwi i jej składników. [W:] Medyczne zasady pobierania krwi, oddzielania jej składników i wydawania, obowiązujące w jednostkach organizacyjnych publicznej służby krwi. Red.: Łętowska M. Instytut Hematologii i Transfuzjologii, Warszawa 2006, 109–221.
- [9] Seyfert U.T., Biehl V., Schenk J.: *In vitro* hemocompatibility testing of biomaterials according to the ISO 10993-4.
- [10] PN-EN ISO 10993-1:2003: Biological evaluation of medical devices. Part 1: Evaluation and test.
- [11] PN-EN ISO 10993-4:2006: Biological evaluation of medical devices. Part 4. Selection of tests for interactions with blood.
- [12] Szymonowicz M., Pielka S., Owczarek A., Haznar D., Pluta J.: Study on influence of gelatin-alginate matrixes on the coagulation system and morphotic blood elements. *Macromol. Symp.* 2007, 253, 71–76.
- [13] Szelest-Lewandowska A., Masiulanis M., Szymonowicz M., Pielka S., Paluch D.: Modified Poly (carbonateurethane). Synthesis, properties and biological investigation *in vitro*. *J. Biomed Mat. Res.* 2007, 82, 12, 509–520.
- [14] Szymonowicz M., Pielka S., Paluch D., Żywicka B., Karuga E., Obłąkowska D., Błazewicz S.: Studies of composite carbon/silicon reaction on cellular morphotic element of blood. *Eng. Biomater.* 2009, 12, 89–91, 130–134.
- [15] Pielka S., Szymonowicz M., Paluch D., Karaś J., Librant Z., Karmelita-Buczyńska H., Jegerman Z.: Investigation of sulphur composites reaction on the coagulation system and cellular elements of blood. *Eng. Biomater.* 2003, 6, 30, 63–66.
- [16] Szymonowicz M., Pielka S., Paluch D., Żywicka B., Karuga E., Obłąkowska D., Błazewicz S.: Influence of carbon materials on blood coagulation. *Eng. Biomater.* 2009, 12, 89–91, 135–139.
- [17] Paluch D., Szymonowicz M., Pielka S., Rutowski R.: *In vitro* studies of the influence polyester materials with a different degree of surface wettability have on blood haematological parameters and coagulation and fibrinolysis system parameters. *Polim. Med.* 2002, 32, 41–64.
- [18] Szymonowicz M., Janus A., Paluch D., Pielka S., Obłąkowska D., Błazewicz S.: Wpływ węgla pirolitycznego na aktywację układu krzepnięcia. *Diagn. Lab.* 2010, 46, 2; 266 poz. 12-P-20. XVII Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Diagnostyki Laboratoryjnej. Wisła, 14–17 września 2010 r. Zbiór streszczeń.
- [19] Paluch D., Szymonowicz M., Pielka S., Majda J.: Wpływ materiałów o różnym stopniu zwilżalności na wybrane parametry układu krzepnięcia. *Polim. Med.* 2001, 31, 1–2, 27–32.
- [20] Szymonowicz M., Janus A., Pielka S., Obłąkowska D., Błazewicz S.: Effect of pyrolytic carbon on the morphological parameters of blood. *Eng. Biomater.* 2010, 13, 96–98, 83–87.
- [21] Koha L.B., Rodriguez I.: The effect of topography of polymer surfaces on platelet adhesion. *Biomater.* 2010, 31, 7, 1533–1545.
- [22] Sobolewska E., Frączak B., Błazewicz S., Seńko K., Lipski M.: Porównanie kąta zwilżalności podstawowych materiałów protetycznych stosowanych w wykonawstwie protez ruchomych w badaniach *in vitro*. *Protet. Stomatol.* 2009, 59, 6, 401–406.



**Adres do korespondencji:**

Maria Szymonowicz  
Zakład Chirurgii Eksperymentalnej i Badania Biomateriałów  
Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu  
ul. Poniatowskiego 2  
50-326 Wrocław  
tel: 71 784 01 35  
faks: 71 784 01 33  
e-mail: maria.szymonowicz@umed.wroc.pl

Konflikt interesów: nie występuje.

Praca wpłynęła do Redakcji: 1.06.2013 r.

Po recenzji: 1.09.2013 r.

Zaakceptowano do druku: 1.09.2013 r.

Received: 1.06.2013

Revised: 1.09.2013

Accepted: 1.09.2013

