

WPLYW WĘGLA PIROLITYCZNEGO NA PARAMETRY MORFOLOGICZNE KRWI

MARIA SZYMONOWICZ^{1*}, ANDRZEJ JANUS¹, STANISŁAW PIELKA¹
DOROTA OBLĄKOWSKA, STANISŁAW BŁĄŻEWICZ²

¹AKADEMIA MEDYCZNA
ZAKŁAD CHIRURGII EKSPERYMENTALNEJ I BADANIA BIOMATERIAŁÓW
UL. PONIATOWSKIEGO 2, 50-326 WROCŁAW, POLSKA

²AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA,
KATEDRA BIOMATERIAŁÓW
AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW, POLSKA
* E-MAIL: BIOCHEM@CHEKSP.AM.WROC.PL

Streszczenie

W pracy przedstawiono analizę ilościową wybranych parametrów morfologicznych krwi po jej czasowym kontakcie z materiałem węglowym LTI. Na podstawie uzyskanych wyników nie stwierdzono zmian w wartościach parametrów układu czerwono-krwinkowego, natomiast zaobserwowano zmiany w wartościach parametrów układu białokrwinkowego i płytkowego. Zaobserwowane zmiany w wartościach parametrów morfologicznych nie przekraczają zakresu wartości referencyjnych dla tych wskaźników.

Słowa kluczowe: węgiel pirolityczny, hemoliza, wskaźniki czerwono-krwinkowe, krwinki białe, płytki krwi

[Inżynieria Biomateriałów, 96-98, (2010), 83-87]

Wprowadzenie

Materiały przeznaczone na trwałe implanty zastępujące chore lub uszkodzone tkanki organizmu powinny odznaczać się obojętnością biologiczną. W zastosowaniach medycznych szczególne znaczenie mają implanty, których powierzchnia pokryta jest węglem pirolitycznym. Warstwy węgla pirolitycznego, podobnie jak większość rodzajów syntetycznego węgla, można otrzymywać w różnych modyfikacjach, poprzez odpowiedni dobór parametrów procesu technologicznego, bez konieczności wprowadzania dodatków modyfikujących. Sprawia to, że możliwości ich zastosowań w medycynie są znaczące, a implanty modyfikowane węglem w coraz większym stopniu, spełniają wymagania stawiane przez nowoczesną medycynę. Optymalne właściwości podłoża, oraz zastosowanie pokrycia węglowego o odpowiednich właściwościach fizycznych, chemicznych i biologicznych, w konstrukcji nowego układu, mogą stanowić perspektywiczny biomateriał z przeznaczeniem do czasowego kontaktu z krwią [1,2].

Celem niniejszej pracy było określenie wpływu węgla pirolitycznego na wybrane parametry morfologiczne krwi.

Materiał

Ocenie poddano niskotemperaturowy pirolityczny węgiel izotropowy w postaci warstwy otrzymanej na podłożu z grafitu syntetycznego (LTI). Próbkę pokrytą warstwą węgla LTI otrzymano techniką CVD w Katedrze Biomateriałów, Wydziału Inżynierii Materiałowej i Ceramiki, AGH, Kraków.

EFFECT OF PYROLYTIC CARBON ON THE MORPHOLOGICAL PARAMETERS OF BLOOD

MARIA SZYMONOWICZ^{1*}, ANDRZEJ JANUS¹, STANISŁAW PIELKA¹
DOROTA OBLĄKOWSKA, STANISŁAW BŁĄŻEWICZ²

¹WROCLAW MEDICAL UNIVERSITY, DEPARTMENT OF EXPERIMENTAL SURGERY AND BIOMATERIALS RESEARCH,
2 PONIATOWSKIEGO STR, 50-326 WROCLAW, POLAND

²AGH - UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY,
DEPARTMENT OF BIOMATERIALS,
30 MICKIEWICZA AVE., 30-059 CRACOW, POLAND
* E-MAIL: BIOCHEM@CHEKSP.AM.WROC.PL

Abstract

A quantitative analysis of selected morphological parameters of blood after its temporal contact with LTI carbon material was presented in the study. The obtained results indicate that the values of parameters of erythrocyte system did not change, while the values of parameters of leukocyte and platelet systems were altered. The changes in the values of parameters did not exceed the range of referential values for these indexes.

Keywords: pyrolytic carbon, haemolysis, red cells parameters, white cells, platelets

[Engineering of Biomaterials, 96-98, (2010), 83-87]

Introduction

The materials designed for permanent implants replacing diseased or damaged tissues of the organism should be characterised by biological inertness. Implants covered with pyrolytic carbon layers have a particular significance in medical applications. Pyrolytic carbon layers, like most kinds of synthetic carbons can be obtained in different modifications, depending on a proper selection of technological process parameters without the necessity of introduction of modifying additions. It makes that possibilities of their applications in medicine are significant, and implants modified with carbon components meet in more and more degree the requirements of modern medicine. The optimal properties of the substrate and use of carbon coatings with suitable physical, chemical and biological properties can constitute perspective materials for contact with blood [1,2].

The aim of this work was to determine the influence of a pyrolytic carbon surface on selected morphological parameters of blood in the in vitro tests.

Material

Low temperature isotropic carbon in the form of layer obtained on synthetic graphite substrate (LTI) was evaluated. The samples coated with LTI carbon by CVD technique have been manufactured at the Department of Biomaterials of the Faculty of Materials Science and Ceramics, AGH, Cracow.

Badania laboratoryjne

Przygotowanie wyciągu wodnego

Z węgla pirolitycznego sporządzono wyciągi wodne z zachowaniem proporcji 4 g materiału na 30 ml wody do iniekcji oraz warunków ekstrakcji 37°C przez 72 godz. Roztwór kontrolny stanowiła woda do iniekcji użyta do sporządzenia wyciągów i inkubowana w tych samych warunkach co badane próby. Oznaczono pH i przewodność elektryczną właściwą [3].

Oznaczenie pH

Pomiary pH wyciągu wodnego oraz kontroli wykonano w temperaturze 20°C z zastosowaniem mikroprocesorowego miernika pH/mV °C typ P-731 z automatyczną kompensacją temperatury, stosując typową elektrodę kombinowaną typ SAgP-301W [4].

Oznaczenie przewodności elektrycznej właściwej

Przewodność elektryczną właściwą mierzono w temperaturze 20°C przy użyciu konduktometru typ N-572 z elektrodą typu PS-2Z [5].

Badania biologiczne in vitro

Badania wykonano na krwi ludzkiej AB Rh+ pobranej na płyn konserwujący CPD (citrate-phosphate-dextrose, USP) [6].

Badanie działania hemolitycznego

Przygotowanie zawiesiny krwinek czerwonych

Pełną krew wirowano z prędkością 1018 x g przez 10 min., następnie odciągnięto osocze, wraz z górną warstwą krwinek czerwonych. Osad krwinek czerwonych przemyto izotonicznym roztworem chlorku sodowego (150 mmol/l), za każdym razem delikatnie mieszając i odwirowując (366 x g przez 15 min) z zachowaniem takiego samego czasu i szybkości wirowania oraz odrzucając płyn znad osadu krwinek. Zagęszczone krwinki czerwone rozcieńczono 10-krotnie, 150 mmol/l roztworem NaCl. Otrzymano 10% zawiesinę krwinek czerwonych.

Oznaczenie odsetka hemolizy

Wyciąg wodny z materiału oraz wodę do iniekcji (kontrola) w ilości 5ml doprowadzono do izotoniczności stałym chlorkiem sodu. Dodano 0,25 ml 10% zawiesiny krwinek czerwonych i inkubowano przez 24 godz. w temp. 37°C. Następnie w płynie znad osadu krwinek czerwonych oznaczono spektrofotometrycznie absorbancję i obliczono odsetek hemolizy, którego wartość nie powinna przekroczyć 1%. Osad krwinek czerwonych oceniono mikroskopowo [7].

Badania hematologiczne

Pełną krew wraz z próbką materiału (0,6g/6ml) oraz bez materiału (kontrola) wprowadzono w ruch wahadłowy (20/min) przez 15, 30, 60, 120 min w temp. pokojowej [8-10]. Po inkubacji pełną krew pobrano do badań hematologicznych i do oceny morfologicznej komórek krwi. We krwi oznaczono wartość hematokrytu (Ht), stężenie hemoglobiny (HGB), liczbę krwinek czerwonych (RBC) oraz wskaźniki czerwonekrwinkowe: średnią objętość krwinki czerwonej (MCV), średnią masę hemoglobiny w krwince czerwonej (MCH), średnie stężenie hemoglobiny w krwinkach czerwonych (MCHC) i rozkład krwinek czerwonych (RDW).

Methods

Laboratory tests

Aqueous extract preparation

Aqueous extracts were prepared from pyrolytic carbon with maintenance of proportion of 4 g of material for 30 ml of water for injection and extraction conditions, 37°C for 72 h. Water for injections used for extracts preparation and incubated in the same conditions as the tested samples constituted the control solution. The pH and electrical conductivity were determined [3].

pH determination

Measurements of pH of aqueous extract and control were performed at 20°C with use of a microprocessor meter pH/mV °C, type P-731 with automatic temperature compensation using a typical combination electrode type SAgP-301W [4].

Electrical conductivity determination

Electrical conductivity was measured at 20°C using a conductometer type N-572 with an electrode type PS-2Z [5].

Biological studies in vitro

The tests were performed on human blood AB Rh+ taken for preserving fluid CPD (citrate-phosphate-dextrose, USP) [6].

Study of the haemolytic action

Erythrocytes suspension preparation

Full blood was centrifugated 1018 x g, for 10 min. and subsequently plasma with the upper layer of erythrocytes was drawn off. Erythrocyte sediment was rinsed with (150 mmol/l) of isotonic sodium chloride solution, stirred gently and centrifugated (366 x g, 15 min) each time maintaining the same time and centrifugation speed removing the fluid over the blood cells sediment. The concentrated erythrocytes were diluted 10 times, 150 mmol/l NaCl solution. Finally, 10% erythrocytes suspension was obtained.

Haemolysis percentage marking

Aqueous extract from the material and water for injection (control) in the amount of 5 ml was brought to isotonic state with a solid sodium chloride. 0.25 ml 10% erythrocytes suspension was added and incubated for 24 h at 37°C. Next, in the fluid taken from above the erythrocytes sediment the absorbance was determined by means of spectrophotometry and haemolysis percentage was counted, the value of which should not exceed 1%. The erythrocytes sediment was evaluated microscopically [7].

Haematological tests

Full blood with a material sample (0.6 g/6ml) and without material (control) was set in a swing move (20/min) for 15, 30, 60, 120 min. at room temperature. After the incubation time the full blood was taken for haematological tests and for morphological evaluation of blood cells [8-10]. There have been determined the following parameters of the blood: the value of haematocrit (Ht), haemoglobin concentration (HGB), red cells count (RBC) and red cells indexes: mean red cell volume (MCV), mean haemoglobin mass in red cell (MCH), mean haemoglobin concentration in red cells (MCHC) and red cell distribution width (RDW). White cells count (WBC) was determined taking into account leucogram: granulocyte (GRA), lymphocyte (LYM) and monocyte (MON) percentage.

Określono liczbę krwinek białych (WBC) z uwzględnieniem leukogramu: odsetka granulocytów (GRA), limfocytów (LYM) i monocytów (MON). Oznaczono liczbę płytek krwi (PLT), średnią objętość płytek (MPV) i hematokryt płytkowy (PCT). Badania wykonano na aparacie hematologicznym Cobas Micros firmy La Roche. W osoczu krwi oznaczono stężenie hemoglobiny pozakrwinkowej metodą cyjanomethemoglobi-nową. Stężenie jonów wodorowych (pH) we krwi oznaczono na aparacie Chiron Diagnostics 248 firmy Bayer.

Analiza statystyczna

Wyniki badań poddano analizie statystycznej. Obliczono średnią arytmetyczną i odchylenie standardowe. Istotne różnice w średnich wartościach parametrów określono testem T dla prób niezależnych, przy poziomie istotności dla $p < 0,05$.

TABELA 1. Badania laboratoryjne wyciągu wodnego z węgla pirolitycznego (LTI).
TABLE 1. Laboratory tests of water extract from LTI carbon material.

Material Material	pH	Δ pH	Przewodność elektryczna właściwa Electrical conductivity [μ S/cm]
Węgiel LTI LTI carbon	6,66	0,14	$2,53 \pm 0,21$
Kontrola Control	6,80	—	$1,60 \pm 0,33$

Wyniki

Wyciągi wodne z węgla LTI był bezbarwne, klarowne i bez zapachu. Próbkki materiału nie zmieniły swojego kształtu i koloru. Wartości pH oraz przewodność elektryczna właściwa wyciągu były porównywalne z wartościami wyznaczonymi dla kontroli. Średnie wartości pH wyciągu z węgla LTI mieściły się w zakresie normy 5,5-7,5 jednostek (TABELA 1). Średnie wartości odsetka hemolizy dla izotonicznego wyciągu z węgla LTI nie przekroczyły dopuszczalnej wartości przyjętej w normie, czyli 1% (TABELA 2).

TABELA 3. Liczba czerwonych krwinek (RBC), stężenie hemoglobiny (HGB) oraz wartość hematokrytu (Ht) we krwi kontrolnej oraz po kontakcie z węglem pirolitycznym (LTI) w funkcji czasu w temperaturze pokojowej.
TABLE 3. Red cells count (RBC), haemoglobin concentration (Hb) and haematocrit in control blood and after contact with the pyrolytic carbon as a function of time at RT.

Min–Max : RBC: 3,80–4,78; HGB: 11,99–12,29; Ht: 35,47–36,39

Material Material	Czas Time min	RBC $10^{12}/L$	HGB g/dl	Ht l/l
Węgiel LTI LTI carbon	15	$4,24 \pm 0,05$	$12,26 \pm 0,15$	$35,96 \pm 0,58$
	30	$4,28 \pm 0,03$	$12,33 \pm 0,07$	$36,05 \pm 0,25$
	60	$4,29 \pm 0,07$	$12,15 \pm 0,05$	$36,20 \pm 0,50$
	90	$4,27 \pm 0,05$	$12,03 \pm 0,07$	$35,95 \pm 0,25$
	120	$4,25 \pm 0,05$	$12,10 \pm 0,10$	$36,26 \pm 0,55$
Kontrola Control	15	$4,26 \pm 0,04$	$12,10 \pm 0,26$	$35,93 \pm 0,46$
	30	$4,29 \pm 0,03$	$12,30 \pm 0,20$	$36,33 \pm 0,44$
	60	$4,27 \pm 0,04$	$12,10 \pm 0,10$	$35,70 \pm 0,30$
	90	$4,29 \pm 0,08$	$12,05 \pm 0,15$	$35,05 \pm 0,60$
	120	$4,26 \pm 0,04$	$12,05 \pm 0,05$	$35,85 \pm 0,45$

Platelets count (PLT), mean platelet volume (MPV) and platelet haematocrit (PCT) were also assessed. The studies were made using a haematologic apparatus Cobas Micros produced by La Roche. Extracellular haemoglobin concentration was marked in plasma with cyanomethemoglobin method. The pH concentration of hydrogen ions in blond were determined by using an apparatus Chiron Diagnostics 248 produced by Bayer.

Statistical analysis

The studies results were subjected to statistical analysis. The mean value and standard deviation were counted. Significant differences in the mean values of parameters were determined with the Student t test for independent samples, with the significance level for $p < 0.05$.

TABELA 2. Wartości odsetka hemolizy dla węgla pirolitycznego (LTI).
TABLE 2. Haemolysis percentage values of the pyrolytic carbon (LTI).

Material Material	Działanie hemolityczne Hemolytic action
	wyciąg/extract 10% erytrocyty/erythrocytes
Węgiel LTI LTI carbon	$0,30 \pm 0,02$

Results

Aqueous extracts from LTI carbon were colourless, clear and without smell. The material samples did not change their shape and colour. The pH values and electrical conductivity of extract were comparable with the values designated for control. The mean pH values of extract from LTI carbon were within the standard range of 5.5-7.5 units (TABLE 1). The mean values of haemolysis percentage for an isotonic extract from LTI carbon did not exceed the acceptable value in the standard, that is 1% (TABLE 2). The proper shape of red blood cells containing fairly regular short cytoplasmatic protuberances was observed in a microscopic image, and the shape did not vary from that observed in the control cells. The mean values of haematological parameters for control blood and after contact with LTI carbon at RT after 15, 30, 60, 120 min and the range of referential values (Min-Max) for blood used in the tests are gathered in TABLES 3-7.

Red cells count, haemoglobin concentration, haematocrit value after contact with LTI carbon at all times of observation were comparable with the values in control group (TABLE 3). Mean value of erythrocytes, haemoglobin mass and haemoglobin concentration in erythrocytes for all times of measurement were comparable with the values of those obtained for control group (TABLE 4). A decreasing tendency was noted for white cells count. The largest differences were observed after 90 min ($p < 0.01$). Prolongation of a contact time till 120 min. did not influence significantly ($p < 0.05$) in WBC decreasing. The percentage of lymphocytes, monocytes and granulocytes was similar to the values in the control group (TABLE 5). Platelets count in blood after 30, 60 and 90 min ($p < 0.05$) and 120 min ($p < 0.01$) of contact with LTI carbon decreased significantly in comparison to the control group.

TABELA 4. Wartości wskaźników czerwonek: średnia objętość krwinki (MCV), średnia masa hemoglobiny (MCH), średnie stężenie hemoglobiny w krwinkach (MCHC) we krwi kontrolnej oraz po kontakcie z węglem pirolitycznym (LTI) w funkcji czasu w temperaturze pokojowej.

TABLE 4. Red cells parameters: mean red cell volume (MCV), mean corpuscular haemoglobin in red cell (MCH), mean corpuscular haemoglobin concentration in red blood cells (MCHC) in control blood and after contact with the pyrolytic carbon as a function of time at RT.

Min – Max : MCV: 83,89-84,85; MCH: 28,55-28,95; MCHC: 33,88-34,62.

Material	Czas Time min	MCV um	MCH pg	MCHC g/dl
Węgiel LTI LTI carbon	15	84,50 ± 0,57	28,47 ± 0,17	33,60 ± 0,15
	30	84,25 ± 0,50	28,60 ± 0,14	33,90 ± 0,11
	60	84,75 ± 0,50	28,50 ± 0,22	33,50 ± 0,50
	90	84,37 ± 0,47	28,57 ± 0,18	33,86 ± 0,13
	120	84,50 ± 0,40	28,52 ± 0,17	33,72 ± 0,26
Kontrola Control	15	84,33 ± 0,47	28,52 ± 0,15	33,73 ± 0,25
	30	84,50 ± 0,60	28,58 ± 0,16	33,80 ± 0,16
	60	84,50 ± 0,40	28,60 ± 0,17	33,86 ± 0,13
	90	84,50 ± 0,40	28,55 ± 0,12	33,47 ± 0,30
	120	84,50 ± 0,40	28,57 ± 0,13	33,43 ± 0,55

W obrazie mikroskopowym stwierdzono prawidłowy kształt krwinek czerwonych. Zawierały one dość regularne, krótkie wypustki cytoplazmy i swoim kształtem nie odbiegały od krwinek w kontroli.

Średnie wartości parametrów hematologicznych wraz z odchyleniem standardowym dla krwi kontrolnej oraz po kontakcie z węglem LTI w temp. pokojowej po 15, 30, 60, 120 min oraz zakres wartości referencyjnych (Min-Max) dla krwi użytej do badań podano w TABELACH 3-7.

Liczba krwinek czerwonych, stężenie hemoglobiny, wartość hematokrytu po kontakcie z materiałem węglowym LTI we wszystkich czasach obserwacji była porównywalna z wartościami w grupie kontrolnej (TABELA 3). Średnia objętość krwinek czerwonych, masa hemoglobiny oraz stężenie hemoglobiny w krwinkach czerwonych we wszystkich czasach pomiaru była porównywalna do wartości tych parametrów w grupie kontrolnej (TABELA 4). Liczba krwinek białych wykazywała tendencję spadkową. Największe różnice obserwowano po 90 min ($p < 0,01$). Wydłużenie czasu kontaktu do 120 min nie wpłynęło na istotne ($p < 0,05$) zmniejszenie WBC. Odsetek limfocytów, monocytów i granulocytów był zbliżony do wartości w grupie kontrolnej (TABELA 5). Liczba krwinek płytkowych we krwi po 30, 60 i 90 min ($p < 0,05$) oraz 120 min ($p < 0,01$) kontaktu z węglem LTI istotnie zmniejszyła się w porównaniu do kontroli. Stwierdzone wartości PLT po 60, 90 i 120 min były do siebie zbliżone oraz mieściły się w zakresie wartości referencyjnych. Wartości hematokrytu płytkowego oraz średnie objętości płytek były porównywalne do wartości w grupie kontrolnej (TABELA 6). Stężenie hemoglobiny pozakrwinkowej istotnie zwiększyło się po 15 min ($p < 0,05$), 30 min ($p < 0,001$) oraz 60, 90 i 120 min. ($p < 0,01$). Największe zwiększenie Hb w porównaniu do kontroli zaobserwowano po 30 min. Stwierdzone wartości były porównywalne i nie przekroczyły 40 mg/dl, wartości objętej normą. Wartości pH krwi po kontakcie z materiałem węglowym LTI we wszystkich czasach obserwacji były porównywalne i zbliżone do wartości w grupie kontrolnej (TABELA 7).

The observed PLT values after 60, 90 and 120 min were similar to each other and they were within the range of referential values. The values of platelet haematocrit and the mean platelet volume were comparable with the value in control group (TABLE 6). Extracellular haemoglobin concentration increased significantly after 15 min ($p < 0,05$), 30 min. ($p < 0,001$) and 60, 90 and 120 min. ($p < 0,01$). The largest increase of Hb in comparison with control was observed after 30 min. The observed values were comparable and did not exceed 40 mg/dl of the value given in the standard. The pH values of blood after contact with LTI carbon for all times of observation were comparable and similar to the values in control group (TABLE 7).

Summary

Biocompatibility, stability of material in body fluids and direct interaction with the morphological parameters of blood are connected both with the chemical nature and physical state of an implant. The purpose of the study was: biological evaluation in vitro evaluation of low temperature isotropic carbon in the form of layer obtained on synthetic graphite substrate as material that can be applied in the form of implant for direct contact with blood. The evaluation of the effect of LTI carbon on blood was made on the basis of quantitative changes of the selected parameters of erythrocyte (HGB, Ht, RBC), leucocyte (WBC, LYM, MON, GRAN), platelet (PLT, MPV, PCT) systems.

Changes in the pH values and electrical conductivity were not observed in aqueous extracts from pyrolytic carbon.

In the tests of haemolytic interaction of extract from LTI carbon material, the determined value of haemolysis percentage did not exceed 0.5%, whereas 1% level is the accepted upper haemolysis value in relation to materials designed for a direct contact with blood. The obtained results prove the lack of compounds in extract influencing the release of haemoglobin from the red cells. The evaluation of the effect of LTI carbon surface on blood was made on the basis of quantitative changes of the selected haematological parameters. Full blood was subjected to a temporal direct contact with the material. A decrease of white cells count, platelets count and an increase of extracellular Hb concentration in blood were observed.

TABELA 5. Liczba białych krwinek (WBC), wartość odsetka limfocytów (LYM), monocytów (MON) i granulocytów (GRAN) we krwi kontrolnej i po kontakcie z węglem pirolitycznym (LTI) w funkcji czasu w temperaturze pokojowej.

TABLE 5. White cells count (WBC) and lymphocyte (LYM), monocyte (MON) and granulocyte (GRAN) differentia count in the control blood and after contact with the pyrolytic carbon (LTI) as a function of time at RT.

Min – Max : WBC: 4,16-4,42; LYM: 30,39-33,21; MON: 5,90-7,10; GRAN: 61,49-64,11; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

Material	Czas Time min	WBC 10 ⁹ /l	LYM %	MON %	GRAN %
Węgiel LTI LTI carbon	15	4,20 ± 0,13	30,85 ± 0,21	6,35 ± 0,07	62,80 ± 0,14
	30	4,18 ± 0,14	32,65 ± 0,49	6,35 ± 0,93	61,00 ± 1,41
	60	3,75 ± 0,35*	32,43 ± 2,68	6,24 ± 0,86	61,33 ± 1,48
	90	3,65 ± 0,21**	33,88 ± 0,80	6,13 ± 0,35	59,99 ± 1,11
	120	3,70 ± 0,14*	33,50 ± 2,50	6,40 ± 0,80	60,10 ± 1,40
Kontrola Control	15	4,22 ± 0,28	31,10 ± 0,63	5,93 ± 0,37	62,97 ± 0,96
	30	4,30 ± 0,07	30,40 ± 1,39	6,30 ± 0,40	63,30 ± 1,62
	60	4,20 ± 0,14	30,54 ± 1,83	6,46 ± 0,35	63,00 ± 1,41
	90	4,00 ± 0,14	32,43 ± 1,00	6,21 ± 0,25	61,36 ± 0,87
	120	3,90 ± 0,14	32,15 ± 0,35	6,30 ± 0,28	61,55 ± 0,50

Podsumowanie

Stopień biogodności, stabilność materiału w płynach ustrojowych i bezpośrednie oddziaływanie na parametry morfologiczne krwi związane są zarówno ze strukturą jak i chemiczną, i fizycznym stanem implantu. Celem przeprowadzonych badań była ocena biologiczna in vitro niskotemperaturowego pirolitycznego węgla izotropowego w postaci warstwy otrzymanej na podłożu z grafitu syntetycznego jako materiału mogącego mieć zastosowanie w formie wszczepu do bezpośredniego kontaktu z krwią. Ocenę wpływu materiału węglowego LTI na krew dokonano na podstawie ilościowych zmian wybranych parametrów układu czerwono-krwinkowego (HGB, Ht, RBC), białokrwinkowe (WBC, LYM, MON, GRAN), płytkowego (PLT, MPV, PCT).

W badaniach wyciągu wodnego z węgla pirolitycznego nie stwierdzono zmian w wartościach pH i przewodności elektrycznej właściwej. W badaniach działania hemolitycznego wyciągu z materiału węglowego LTI, stwierdzona wartość odsetka hemolizy nie przekroczyła 0,5%. Jako górną dopuszczalną wartość hemolizy w odniesieniu do materiałów przeznaczonych do bezpośredniego kontaktu z krwią przyjmuje się 1%. Uzyskane wyniki świadczą o braku w wyciągu związków wpływających na uwolnienie hemoglobiny z krwinek czerwonych. Ocenę wpływu materiału węglowego LTI, na krew dokonano na podstawie ilościowych zmian wybranych parametrów hematologicznych. Pełną krew poddano czasowemu, bezpośredniemu kontaktowi z materiałem. We krwi stwierdzono zmniejszenie liczby krwinek białych i płytkowych oraz zwiększenie stężenia Hb pozakrwinkowej.

TABELA 7. Stężenie hemoglobiny (Hb) w osoczu oraz pH krwi kontrolnej oraz po kontakcie z węglem pirolitycznym (LTI) w temperaturze 37°C.

TABLE 7. Extracellular haemoglobin concentration and pH in control plasma and after contact with the pyrolytic carbon (LTI) a function of time at room temperature.

Min – Max: Hb: 14,95-15,77; pH; 7,20-7,45; * p<0,05, ** p<0,01, * p<0,001**

Norma/Standard: 0-40 mg/dl

Material Material	Czas Time min	Hb mg/dl	Ph
Węgiel LTI LTI carbon LTI	15	18,36 ± 1,14 *	7,06
	30	19,92 ± 0,39 ***	7,05
	60	20,74 ± 0,46 **	7,05
	90	21,43 ± 0,75 **	7,05
	120	22,24 ± 0,74 **	7,04
Kontrola Control	15	15,55 ± 0,75	7,05
	30	15,55 ± 0,75	7,04
	60	17,05 ± 0,75	7,05
	90	18,07 ± 0,39	7,05
	120	18,47 ± 0,76	7,00

Przeprowadzone badania biologiczne in vitro wykazały, że czasowy bezpośredni kontakt krwi z materiałem węglowym LTI nie zmienia wartości pH krwi, parametrów układu czerwono-krwinkowego, natomiast wpływa na parametry układu białokrwinkowego i płytkowego. Zaobserwowane zmiany nie przekroczyły zakresu wartości referencyjnych oraz wartości zawartej w normie.

Podziękowania

Praca wykonana w ramach projektu badawczego nr 1821 Akademii Medycznej we Wrocławiu.

TABELA 6. Liczba płytek krwi (PLT), hematokryt płytkowy (PCT) średnia objętość płytek (MPV) we krwi kontrolnej oraz po kontakcie z węglem pirolitycznym (LTI) w funkcji czasu w temperaturze pokojowej.

TABLE 6. Platelets count (PLT), platelet haematocrit (PCT), mean platelet volume (MPV) in the control blood and after contact with the pyrolytic carbon (LTI) a function of time at RT

Min – Max: PLT: 194-210; PCT: 0,11-0,15; MPV: 7,05-7,27; * p<0,001.

Material Material	Czas Time min	PLT 10 ⁹ /l	PCT %	MPV fl
Węgiel LTI LTI carbon	15	193,5 ± 7,50	0,14 ± 0,005	7,40 ± 0,14
	30	184,0 ± 6,00*	0,12 ± 0,002	7,00 ± 0,14
	60	173,0 ± 10,21*	0,12 ± 0,01	7,15 ± 0,07
	90	172,0 ± 8,02*	0,12 ± 0,004	7,20 ± 0,14
	120	174,0 ± 7,50*	0,12 ± 0,02	7,20 ± 0,10
Kontrola Control	15	205,5 ± 5,50	0,14 ± 0,02	7,36 ± 0,11
	30	186,5 ± 8,02	0,13 ± 0,008	7,25 ± 0,07
	60	180,8 ± 5,03	0,13 ± 0,006	7,20 ± 0,14
	90	196,3 ± 5,51	0,13 ± 0,01	7,15 ± 0,35
	120	195,6 ± 5,50	0,13 ± 0,01	7,15 ± 0,07

The performed biological studies in vitro showed that a temporal direct contact of blood with LTI carbon surface does not change the pH values of blood, erythrocyte system parameters. On the contrary it influences the parameters of leucocyte and platelet systems. The observed changes did not exceed the range of referential values and the standard values.

Acknowledgements

The work was supported by the project No.1821 of the Wrocław Medical University.

Piśmiennictwo

References

- [1] Błażewicz S., Chłopek J., Błażewicz M.: Biomateriały węglowe i kompozytowe. W: Biocybernetyka i Inżynieria Biomedyczna, t.4, Biomateriały, red. Błażewicz S., Stoch L., Akademicka Oficyna Wydawnicza, Warszawa (2003), 332-423.
- [2] Nawrot Z.: Biomateriały w kardiochirurgii. W: Biocybernetyka i Inżynieria Biomedyczna, t.4, Biomateriały, red. Błażewicz S., Stoch L., Akademicka Oficyna Wydawnicza, Warszawa (2003), 530-581.
- [3] Biological evaluation of medical devices. Part 12: Sample preparation and reference materials. PN-EN ISO 10993-12, (2005), 1-15.
- [4] Oznaczanie pH wodnych roztworów produktów chemicznych. Polska Norma 86/C-04963.
- [5] Oznaczanie przewodności elektrycznej właściwej wyciągów wodnych. Polska Norma 76/C-89291.
- [6] Biological evaluation of medical devices. Part 4. Selection of tests for interactions with blood. PN-EN ISO 10993-4, (2003), 1-34.
- [7] Szymonowicz M., Pielka S., Paluch D., Żywicka B., Obłąkowska D., Błażewicz S.: Studies of the hemolytic action of the chosen carbon materials. Inż. Biomater. 77-80, (2008), 21-22.
- [8] Szymonowicz M., Pielka S., Paluch D., Żywicka B., Karuga E., Obłąkowska D., Błażewicz S.: Studies of composite carbon/silicon reaction on cellular morphotic element of blood. Eng. Biomater., 2009, 12, (89-91), 130-134.
- [9] 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. Part A, 82, 12, (2007), 509-520.
- [10] 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. Macromolecular Symposia 253, (2007), 71-76.