

# BADANIA BIOLOGICZNE WARSTW POWIERZCHNIOWYCH W ASPEKcie ZASTOSOWANIA NA PIERŚCIEŃ ZASTAWKI SERCA

M. GONSIOR<sup>1\*</sup>, R. KUSTOSZ<sup>1</sup>, T. BOROWSKI<sup>2</sup>, M. OSSOWSKI<sup>2</sup>,  
M. SANAK<sup>3</sup>, B. JAKIEŁŁA<sup>3</sup>, E. CZARNOWSKA<sup>4</sup>, T. WIERZCHOŃ<sup>2</sup>

<sup>1</sup> FUNDACJA ROZWOJU KARDIOCHIRURGII, ZABRZE

<sup>2</sup> WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ POLITECHNIKI WARSZAWSKIEJ

<sup>3</sup> COLLEGIUM MEDICUM UNIwersYTETU JagIELLOŃSKIEGO, KRAKÓW

<sup>4</sup> CENTRUM ZDROWIA DZIECKA W WARSZAWIE

\* E-MAIL: GOSIAG@FRK.PL

## Streszczenie

Oryginalna sztuczna komora wspomaganie serca POLVAD opracowana w Polsce, została zastosowana dotychczas w leczeniu ponad 210 pacjentów. Najdłuższe wspomaganie serca za pomocą komory POLVAD trwało ponad rok. Dla protezy tej opracowywana jest innowacyjna zastawka dyskowa, z nisko profilowym pierścieniem wykonanym ze stopu tytanu. Dla zminimalizowania trombogenności pierścienia zastawki opracowano dyfuzyjne warstwy powierzchniowe: azotowaną typu  $TiN+Ti_2N+\alpha Ti(N)$  i tlenoazotowaną typu  $TiO_2+TiN+Ti_2N+\alpha Ti(N)$ , wytwarzane obróbką jarzeniową na potencjale plazmy. Trombogenność różnych kompozycji warstw została porównana w aspekcie aktywacji i adhezji płytek krwi do powierzchni biomateriału. Oceniono również wpływ metody sterylizacji biomateriału na intensywność adhezji trombocytów do jego powierzchni. Warstwy  $TiN$  oraz  $TiO_2$  wykazały najniższą trombogenność, przy czym dla warstwy  $TiN$  korzystniejsza jest sterylizacja gazowa, podczas gdy dla warstwy  $TiO_2$  - sterylizacja plazmowa.

[Inżynieria Biomateriałów, 102, (2011), 15-22]

## Wprowadzenie

Mechaniczne protezy zastawek serca są wszczepiane jako implanty w miejsce uszkodzonej natywnej zastawki serca, ale stosowane są także w sztucznych sercach i komorach wspomaganie serca na całym świecie. W Polsce od 1999 r. stosowany jest system wspomaganie serca POLCAS, w skład którego wchodzi pozaustrojowa komora wspomaganie serca POLVAD i jednostka sterująca pracą komory. Do dnia dzisiejszego system POLCAS został zastosowany w leczeniu ponad 210 pacjentów w przypadkach ostrej niewydolności serca - jako pomost do regeneracji lub transplantacji serca. Najdłuższe wspomaganie serca za pomocą komór POLVAD trwało 403 dni. Komora POLVAD (RYS. 1a) początkowo wyposażona była w zastawki dyskowe firmy Sorin (RYS. 1b), dzisiaj wyposażona jest w zastawki dyskowe firmy Medtronic Hall (RYS. 1c). Cechą charakterystyczną tych zastawek jest wysoki profil elementu prowadzącego dysk zastawki - zlokalizowanego w centrum strumienia krwi przepływającej przez zastawkę. Element ten powoduje regionalne turbulencje przepływu krwi, zwiększając ryzyko powstawania skrzepin w obszarze pierścienia zastawki. W ramach programu „Polskie Sztuczne Serce” prowadzone są badania nad opracowaniem konstrukcji oryginalnej polskiej zastawki dyskowej dla protezy serca, bazującej na projekcie zastawki prof. J. Molla [Moll J.J. patent USA 4.661.106, 1987; Moll J.J. patent USA 4.725.275, 1987].

# BIOLOGICAL PROPERTIES OF SURFACE LAYERS FOR RING OF HEART VALVE APPLICATION

M. GONSIOR<sup>1\*</sup>, R. KUSTOSZ<sup>1</sup>, T. BOROWSKI<sup>2</sup>, M. OSSOWSKI<sup>2</sup>,  
M. SANAK<sup>3</sup>, B. JAKIEŁŁA<sup>3</sup>, E. CZARNOWSKA<sup>4</sup>, T. WIERZCHOŃ<sup>2</sup>

<sup>1</sup> FOUNDATION FOR CARDIAC SURGERY DEVELOPMENT, ZABRZE

<sup>2</sup> MATERIAL ENGINEERING DEPARTMENT,  
WARSAW TECHNOLOGICAL UNIVERSITY

<sup>3</sup> COLLEGIUM MEDICUM JAGIELLONIAN UNIVERSITY, KRAKOW

<sup>4</sup> THE CHILDREN'S MEMORIAL HEALTH INSTITUTE IN WARSAW

\* E-MAIL: GOSIAG@FRK.PL

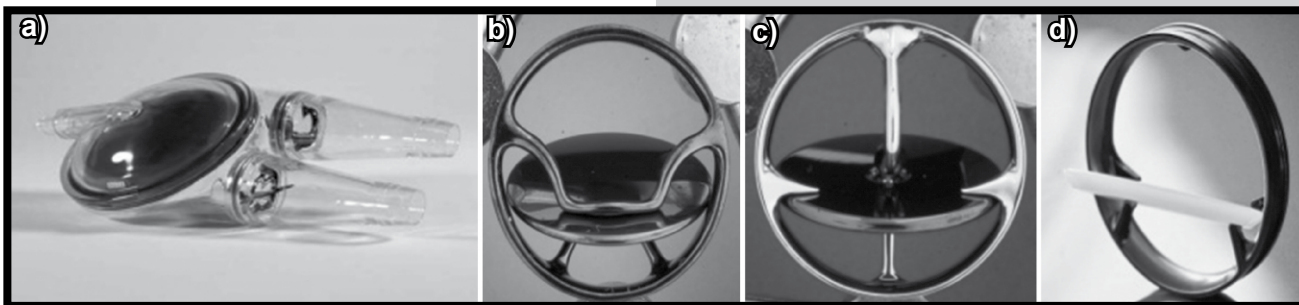
## Abstract

The original ventricular assist device POLVAD developed in Poland was used in over 210 patients so far. The longest POLVAD heart assistance excided one year. The innovative tilting disk valve with low profile ring made of titanium is developed for POLVAD. To minimize the valve ring thrombogenicity the diffusive surface layers were manufactured: nitriding  $TiN+Ti_2N+\alpha Ti(N)$  and oxynitriding  $TiO_2+TiN+Ti_2N+\alpha Ti(N)$ , in the glow discharge process on the plasma potential level. The thrombogenicity of different layers composition was compared regarding platelets activation and platelets adhesion to the material surface. The influence of material sterilization method on the platelets adhesion intensity was evaluated in addition. The nitriding  $TiN$  and oxynitriding  $TiO_2$  layers have demonstrated the lowest thrombogenicity while the gas sterilization was the most profitable for nitriding layers –  $TiN$  and the plasma sterilization for oxynitriding layers –  $TiO_2$ .

[Engineering of Biomaterials, 102, (2011), 15-22]

## Introduction

The mechanical heart prostheses are used as the implants in the place of damaged native heart valve, but they are also used in the ventricular assist devices and artificial hearts all over the world. The original mechanical circulatory system POLCAS is clinically used since 1999. It consists of the ventricular assist device POLVAD and the driving unit POLPDU. Until now it was used in more than 210 cases of the end stage heart failure support – as the bridge to the heart regeneration or heart transplantation. The longest effective heart assistant with ventricular assist device POLVAD lasted 403 days. The ventricular assist device POLVAD (FIG. 1a) firstly was provided with Sorin tilting disc valves (FIG. 1b), currently the tilting disk Medtronic Hall valves (FIG. 1c) are used. The feature of these valves is high profile of the elements holding the valve disc – located in the centre of the blood flow. The holding disc element causes local blood flow turbulences increasing the risk of thrombus formation in the valve ring area. Within the national research program “Polish Artificial Heart” the new construction tilting disk valve is performed pursuant originally proof. J. Moll construction [Moll J.J. patent USA 4.661.106, 1987; Moll J.J. patent USA 4.725.275, 1987]. The ring elements holding the valve disc are small and they are located very close to the valve ring releasing the blood flow area from disturbing blood flow profiles (FIG. 1d).



**RYS. 1.** a) sztuczna komora POLVAD; b) zastawka dyskowa Sorin; c) zastawka dyskowa Medtronic Hall; d) nowa zastawka dyskowa.

**FIG. 1.** a) ventricular assist device POLVAD; b) tilting disc Sorin valve; c) tilting disc Medtronic Hall valve; d) new tilting disc valve.

Pierścien tej zastawki prowadzi dysk za pomocą małych elementów (RYS. 1d), zlokalizowanych przy ścianie pierścienia, uwalniając przestrzeń przepływu krwi przez zastawkę od profili wywołujących zaburzenia przepływu.

Ze względu na wysoką biogodność oraz wysoką odporność na biodegradację tytanu i jego stopów [1-3] w opracowywanej zastawce przewidywane jest wykorzystanie tych materiałów na pierścieniu zastawki. Opisywana w literaturze wysoka trombogenicność tytanu i jego stopów [4,5] stanowi podstawę badań nad opracowaniem warstw modyfikujących powierzchnię pierścienia zastawki w aspekcie zapewnienia niskiej trombogenicności powierzchni biomateriału przy jednoczesnym zachowaniu dobrych właściwości mechanicznych tytanu i jego stopu. W pracy przeprowadzono badania porównawcze trombogenicności trzech warstw azotowanych, tlenoazotowanych i tlenowęgloazotowanych z przypowierzchniową strefą faz: TiN, TiO<sub>2</sub>, Ti(OCN) wytworzonych na podłożu stopu tytanu Ti6Al4V metodą niskotemperaturowych obróbek jarzeniowych. Trombogenicność oceniano poprzez porównanie stopnia, w jakim powierzchnia biomateriału aktywuje trombocyty. Oceny aktywacji trombocytów dokonano w warunkach statycznej i dynamicznej ekspozycji powierzchni biomateriału do krwi. W pracy wykonano również analizę wpływu metody sterylizacji na własności trombogeniczne powierzchni wytworzonych warstw.

## Materiał i metody

Dyfuzyjne warstwy powierzchniowe zostały wytworzone na Wydziale Inżynierii Materiałowej Politechniki Warszawskiej w procesach azotowania, tlenoazotowania i tlenowęgloazotowania. Trzy warstwy dyfuzyjne o strukturze nanokrystalicznej i grubości rzędu kilku μm typu (skład fazowy warstw od powierzchni): TiN+Ti<sub>2</sub>N+αTi(N), TiO<sub>2</sub>+TiN+Ti<sub>2</sub>N+αTi(N) oraz Ti(OCN)+TiN+Ti<sub>2</sub>N+αTi(N) zostały wytworzone w niskotemperaturowych procesach obróbek jarzeniowych w temperaturze poniżej 700°C na wypolerowanych dyskach ze stopu Ti6Al4V (o średnicy 14,5 mm i grubości 3 mm).

### Badanie topografii i struktury powierzchni

Mikrostrukturę warstwy oceniono w badaniach na mikroskopie skaningowym (HITACHI S-3500). Pomiary chropowatości powierzchni wykonano profilometrem (Wyko NT9300) oraz na mikroskopie sił atomowych (Veeco model Multimode Nanoscope V).

### Badania trombogenicności powierzchni

Badania trombogenicności powierzchni wykonano w dwóch różnych modelach warunków kontaktu krwi z powierzchnią biomateriału: statycznych i dynamicznych.

Due to high biocompatibility and high biodegradation resistance of titanium and its alloys [1-3], using these materials to the valve ring construction is taken into account. High thrombogenicity of titanium and its alloys [4,5] reported in the literature, is a basis for development of modified layers on the valve ring surface, in order to provide low biomaterial surface thrombogenicity and protect the good titanium mechanical properties at the same time. The comparative thrombogenicity tests of the nitriding, oxynitriding and carboxynitriding layers with the surface phase areas: TiN, TiO<sub>2</sub> and Ti(OCN) produced on the titanium alloy in the low temperature glow discharge process were done. The thrombogenicity was evaluated by the comparison of the platelets activation due to the biomaterial surface contact. The platelets activation in the conditions of static and dynamic biomaterials surface exposure to the blood was evaluated. The influence of sterilization method influence on the layers surface thrombogenicity was also evaluated.

## Materials and methods

The diffusive layers were produced by the Material Engineering Department of Warsaw Technological University in the nitriding, oxynitriding and carboxynitriding processes. The three diffusive nano-crystalline layers with micrometric thickness type (the layers phase composition from the surface): TiN+Ti<sub>2</sub>N+αTi(N), TiO<sub>2</sub>+TiN+Ti<sub>2</sub>N+αTi(N) and Ti(OCN)+TiN+Ti<sub>2</sub>N+αTi(N) were produced in the low temperature glow discharge process in the temperature below 700°C, on the polished disk surface made of titanium alloy Ti6Al4V (14.5 mm diameter; 3 mm thickness).

### Surface topography and structure tests

The layer microstructure was evaluated by the scanning microscope examination (HITACHI S-3500). The surface roughness was evaluated using the profilometry (WykoNT9300) and the atomic force microscope (Veeco Multimode Nanoscope V).

### The surface thrombogenicity tests

The surface thrombogenicity tests were done in the different conditions: static and dynamic biomaterials surface exposure to the blood.

*In the static thrombogenicity tests* the biomaterial samples were incubated for 20 minutes and 2 hours in the temperature of 37°C in 400 μl of rich platelets plasma, which was prepared from the blood of two healthy donors. The cells adhered to the samples surface were fixed with 2.5% glutaraldehyde and dehydrated with increasing concentration of ethylene alcohols and propylene oxide. Then the cells were covered with the gold layer of 10-15 nm thickness (Fine coater Jeol JFC 1200).



*Badania w warunkach statycznych* polegały na ekspozycji próbek biomateriału przez czas 20 minut i 2 godzin w temperaturze 37°C w 400 µl osocza bogato płytkowego, przygotowanego z krwi dwóch zdrowych dawców. Komórki zaadherowane na powierzchni próbek utrwalane w 2,5% glutaraldehydzie w buforze kaskodylowym odwadniano w alkoholach etylowych o rosnących stężeniach i w tlenku propylenu. Następnie napyłano warstwą złota grubości ok. 10-15 nm (Fine coater Jeol JFC 1200). Preparaty badano w mikroskopie skaningowym. Fotografowano losowo wybrane mikroobszary strefy brzegowej i części centralnej próbek. W dalszej kolejności wykonano analizę morfometryczną obserwowanych komórek. Za pomocą badania skaningowej mikroskopii elektronowej analizowano morfologię oraz rozmieszczenie płytek i agregatów płytkowych. Następnie za pomocą programu morfometrycznego CellP (Olympus) zliczano w badanych mikroobszarach zaadherowane płytki i agregaty płytowe ( $n/1420 \mu\text{m}^2$ ).

*Badania w warunkach dynamicznych* polegały na wytworzeniu modelu naprężeń ścinających na granicy powierzchni biomateriału z krwią odpowiadających tym, jakie oddziałują na krew przepływającą przy ścinaniu naczyń tętniczych średniej wielkości. Model takich zjawisk jest wykorzystywany do pomiaru adhezji trombocytów w urządzeniu diagnostycznym Impact-R (DiaMed, Szwajcaria). Nad próbką materiału (dysk o średnicy 14,5 mm bez i z powierzchniową warstwą) 130 µl krwi wprowadzane jest w wirowanie z prędkością 720 obr/min przez czas 300 sekund. Po ekspozycji krew poddawana była ocenie pod kątem: liczebności krążących trombocytów, liczebności agregatów płytkowych (z różnicowaniem na duże i małe) oraz poziomu aktywacji trombocytów wyrażanej ekspresją Selktyny-P oraz receptora GpIIb/IIIa - w badaniu cytometrii przepływowej.

## Rezultaty

### Mikrostruktura i topografia powierzchni

Warstwy wytworzone w procesach azotowania, tlenoazotowania i tlenowęglazotowania jarzeniowego wykazywały jednorodną strukturę w całym przekroju próbki (RYS. 2), posiadały jednorodną topografię powierzchni (RYS. 3,4, TABELA 1) i mikrotwardość powierzchni (kolejno): TiN – 1200 HV 0.05, TiO<sub>2</sub> – 880 HV 0.02, Ti(OCN) – 1300 HV 0.05.

### Trombogenność powierzchni w warunkach statycznych

#### Adhezja płytek do powierzchni biomateriału

Pierwszym badanym aspektem była adhezja płytek krwi do powierzchni próbek biomateriałów po statycznej ekspozycji do osocza bogato płytkowego. Zaobserwowano różnice w adhezji płytek w strefie brzegowej w porównaniu ze strefą centralną wszystkich badanych próbek. Mniejsza ilość płytek krwi zaadherowała na krawędziach niż w środku próbek (RYS. 5). Liczba płytek krwi zaadherowanych na próbkach istotnie zależała od sposobu ich sterylizacji w przypadku warstw tlenowęglazotowanych – Ti(OCN) oraz stopu tytanu (Ti), przy czym była większa na płytkach sterylizowanych gazowo niż plazmowo (RYS. 6,7). Analiza porównawcza badanych biomateriałów wykazała najmniejszą adhezję płytek krwi na próbkach z warstwami azotowanymi – TiN i tlenoazotowanymi – TiO<sub>2</sub>.

The preparations were tested in scanning microscope. The micro areas of the sample edge and sample centre randomly chosen were photographed. Afterwards the morphometric analysis of the observed cells was done. The platelets morphology, platelets and platelets aggregates arrangement were analyzed by the scanning electron microscope. Using the morphometric program CellP (Olympus) the adhered platelets and platelets aggregates in tested micro areas were counted ( $n/1420 \mu\text{m}^2$ ).

*The dynamic thrombogenicity tests* consists in the shear-stress model creating in the blood layer contacting biomaterial surface, similar like the shear-stresses affecting on the blood flowing near the vessel wall in the medium size arteries. The shear-stress model is used to test the platelets adhesion in the diagnostic equipment Impact-R (SiaMed, Switzerland). Over the material sample (the disc with and without diffusive layer - diameter 14.5 mm) 130 µl of blood is rotating with velocity 720 rpm/min for 300 s. After the exposure the blood parameters were analyzed: the number of platelets consequently circulating in the blood, number of the platelets aggregates (small and big platelets aggregates) and the platelets activation examined by the expression of GpIIb/IIIa and selectin-P receptors in the flow cytometry test.

## Results

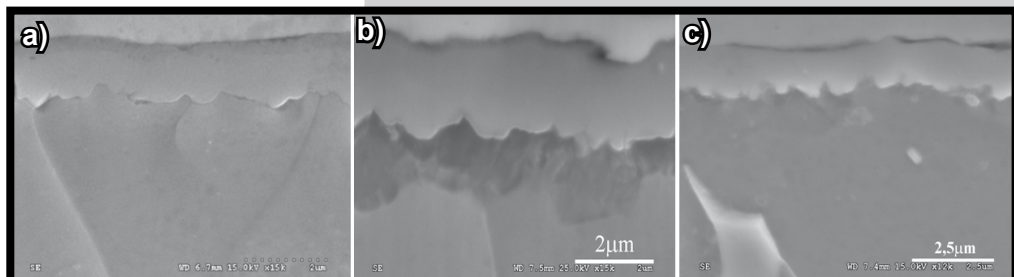
### Surface microstructure and topography

The layers produced in the glow discharge nitriding, oxy-nitriding and carboxynitriding process, have the homogeneous structure in the whole sample cross-section (FIG. 2), homogeneous surface topography (FIG. 3,4, TABLE 1) and micro hardness of the surface (in sequence): TiN – 1200 HV 0.05, TiO<sub>2</sub> – 880 HV 0.02, Ti(OCN) – 1300 HV 0.05.

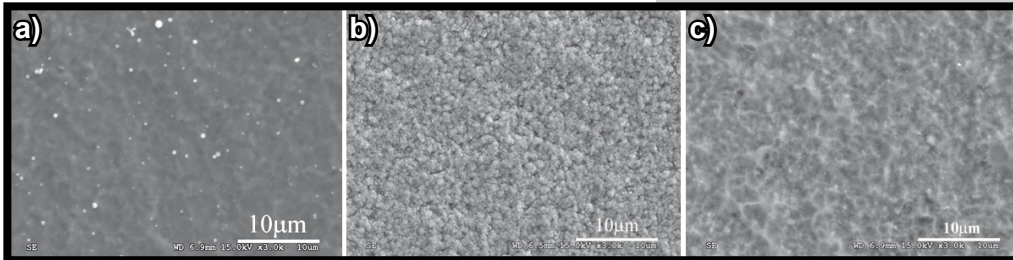
### Static surface thrombogenicity tests

#### Platelets adhesion to the biomaterial surface

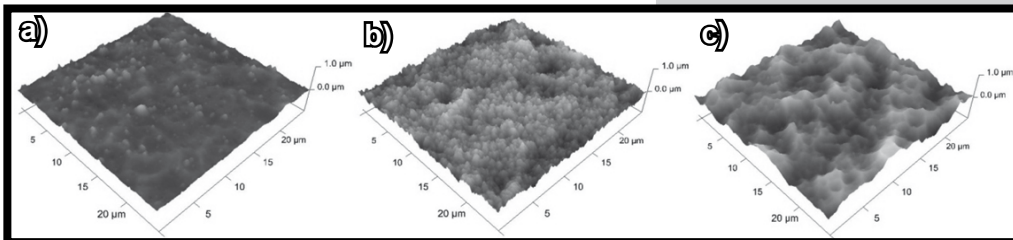
The first analyzed parameter was platelets adhesion to the biomaterials surface, after static exposure to the platelet rich plasma. The platelets adhesion differences in the sample peripheral area comparing with the sample central area were observed. The lower number of adhered platelets was observed in the samples periphery than in the samples centre (FIG. 5). The number of adhered platelets essentially depended on sterilization method in the case of carboxynitriding layer - Ti(OCN) and titanium alloy (Ti6Al4V) - the higher number of adhered platelets was observed after gas sterilization than after plasma sterilization (FIG. 6,7). The comparative analysis of tested biomaterials showed the lowest platelets adhesion on the nitriding - TiN and oxynitriding - TiO<sub>2</sub> layers.



**RYS. 2. Mikrostruktura stereometryczna warstwy na stopie tytanu Ti6Al4V: a) TiN+Ti<sub>2</sub>N+αTi(N); b) TiO<sub>2</sub>+TiN+Ti<sub>2</sub>N+αTi(N); c) Ti(OCN)+TiN+Ti<sub>2</sub>N+αTi(N).  
FIG. 2. Microstructure of the layers on the titanium alloy Ti6Al4V: a) TiN+Ti<sub>2</sub>N+αTi(N); b) TiO<sub>2</sub>+TiN+Ti<sub>2</sub>N+αTi(N); c) Ti(OCN)+TiN+Ti<sub>2</sub>N+αTi(N).**



**RYS. 3. Topografia warstwy na stopie tytanu Ti6Al4V: a) TiN+Ti<sub>2</sub>N+αTi(N); b) TiO<sub>2</sub>+TiN+Ti<sub>2</sub>N+αTi(N); c) Ti(OCN)+TiN+Ti<sub>2</sub>N+αTi(N).**  
**FIG. 3. Topography of the layers on the titanium alloy Ti6Al4V: a) TiN+Ti<sub>2</sub>N+αTi(N); b) TiO<sub>2</sub>+TiN+Ti<sub>2</sub>N+αTi(N); c) Ti(OCN)+TiN+Ti<sub>2</sub>N+αTi(N).**



**RYS. 4. Topografia warstwy na stopie tytanu Ti6Al4V w badaniu mikroskopii sił atomowych: a) TiN+Ti<sub>2</sub>N+αTi(N); b) TiO<sub>2</sub>+TiN+Ti<sub>2</sub>N+αTi(N); c) Ti(OCN)+TiN+Ti<sub>2</sub>N+αTi(N).**  
**FIG. 4. Topography of the layers on the titanium alloy Ti6Al4V by the atomic force microscopy: a) TiN+Ti<sub>2</sub>N+αTi(N); b) TiO<sub>2</sub>+TiN+Ti<sub>2</sub>N+αTi(N); c) Ti(OCN)+TiN+Ti<sub>2</sub>N+αTi(N).**

**TABELA 1. Parametry chropowatości powierzchni stopu tytanu bez i z wytworzonymi warstwami.**  
**TABLE 1. The stereometric parameters of the titanium alloy surface with the diffusive layers.**

Parametr chropowatości powierzchni / Surface roughness parameters [μm]	Ti6Al4V	TiN	TiO <sub>2</sub>	Ti(OCN)
Ra	0,035	0,138	0,673	0,197
Rq	0,045	0,180	0,886	0,252
Rz	0,363	1,93	8,19	2,41

#### Agregacja płytek na powierzchni biomateriału

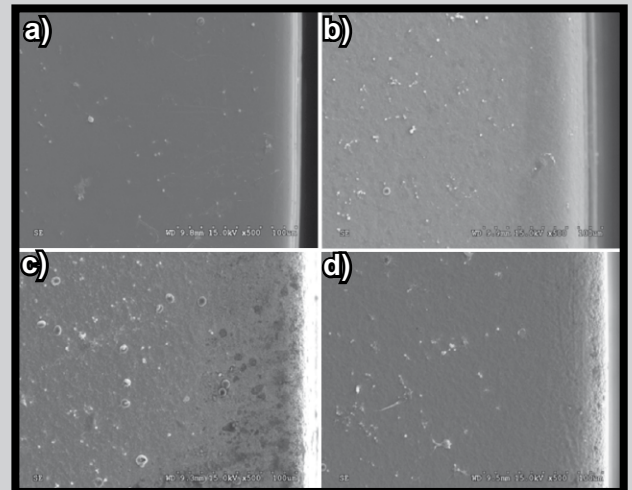
Drugim badanym aspektem była liczebność agregatów płytkowych występujących na powierzchni biomateriału po ekspozycji statycznej do osocza bogato płytkowego. W badaniu mikroskopii elektronowej w części centralnej płytek występowała większa liczba agregatów niż w strefie brzegowej - niezależnie od sposobu sterylizacji. W czasie 20 min inkubacji płytek krwi nie obserwowano znamiennej zmiany wpływu sterylizacji na powstawanie agregatów płytkowych. Natomiast dwugodzinna inkubacja wskazuje, że mniej agregatów tworzy się na powierzchni warstw tlenoazotowanych - TiO<sub>2</sub> i stopie tytanu - Ti6Al4V sterylizowanych gazowo niż plazmowo, natomiast na powierzchni warstw azotowanych - TiN i tlenowęglazotowanych - Ti(OCN) odwrotnie (RYS. 8,9).

#### Morfologia płytek

Ocenić podlegała również morfologia zaadherowanych do powierzchni biomateriału płytek krwi. Rozpłaszczenie płytek krwi i/lub formowanie rozplaszczonych filopodiów są wyrazem ich aktywacji. Obrazy uzyskane w mikroskopii elektronowej wskazują, że na próbkach sterylizowanych gazowo zaadherowane płytki krwi są mniej rozplaszczone i charakteryzuje je obecność długich wypustek (RYS. 10,11).

#### Platelets aggregation on the biomaterial surface

The number of platelets aggregates on the biomaterial surface was tested after static exposure to the platelet rich plasma. The electron microscopy showed that there is higher number of platelets aggregates in the samples centre than in the periphery samples irrespective of sterilization method. There was not observed any important influence of sterilization method on platelets aggregation after 20 min of incubation. Whereas 2 hours incubation resulted in smaller number of platelets aggregated on the oxynitriding layers - TiO<sub>2</sub> and titanium alloy -Ti6Al4V gas sterilized, while on the nitriding layers - TiN and carboxynitriding layers - Ti(OCN) opposite relation was observed (FIG. 8,9).

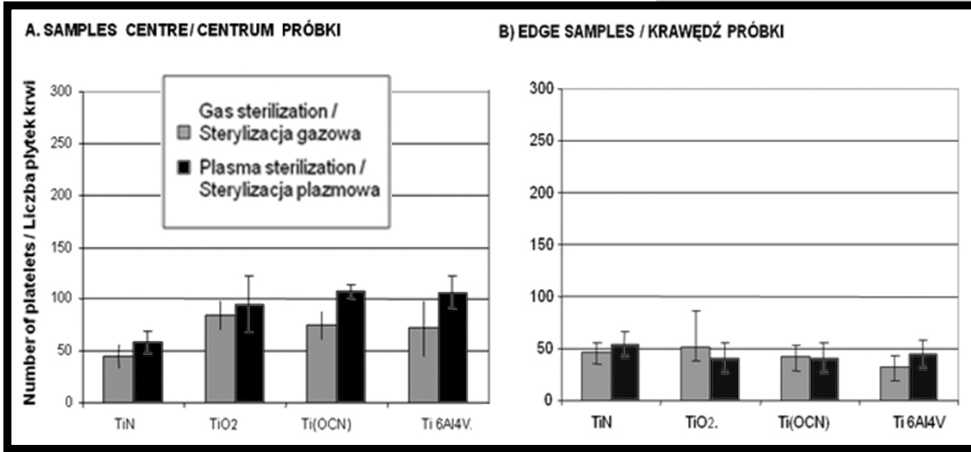


**RYS. 5. Strefa brzegowa próbki ze stopu tytanu Ti6Al4V (a) oraz z warstwami: azotowaną (TiN) (b), tlenoazotowaną (TiO<sub>2</sub>) (c) i tlenowęglazotowaną (Ti(OCN)) (d).**

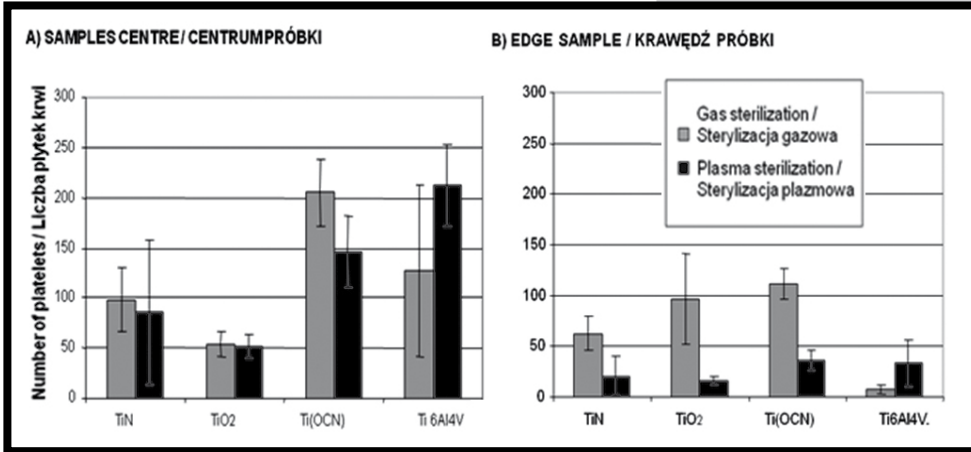
**FIG. 5. The peripheral part of the samples made of titanium alloy Ti6Al4V (a) and nitriding layer (TiN) (b), oxynitriding layer (TiO<sub>2</sub>) (c) and carboxynitriding layer (Ti(OCN)) (d).**

#### Platelets morphology

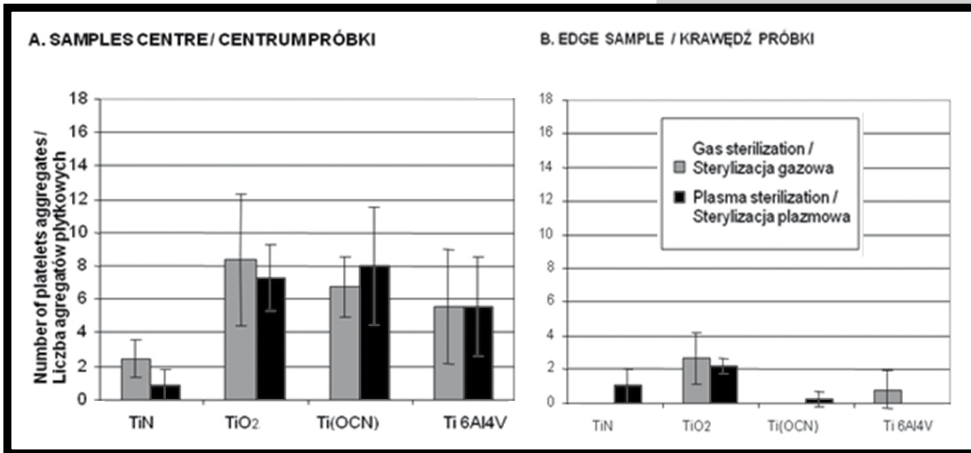
Morphology of platelets adhered to the biomaterials surface was also tested. Platelets flattening and/or platelets pseudopodia expansion are the platelets activation evidences. The electron microscopy showed that adhered platelets are less flatten on the gas sterilized surfaces and they have a lot of long pseudopodia (FIG. 10,11).



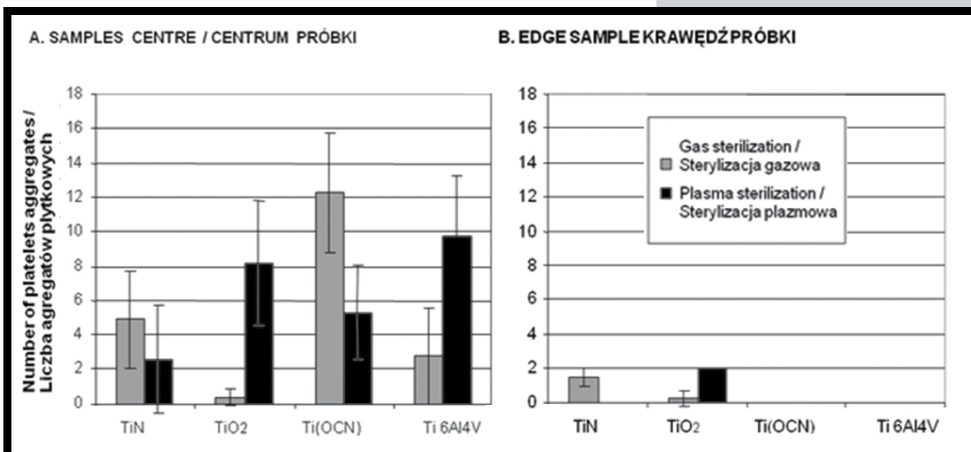
RYS. 6. Liczba płytek krwi w mikroobszarach 1,42 mm<sup>2</sup> badanych biomateriałów po 20 min. inkubacji z osoczem bogato płytkowym.  
FIG. 6. The platelets number in the micro areas 1.42 mm<sup>2</sup> of tested biomaterials after 20 min incubation in platelet rich plasma.



RYS. 7. Liczba płytek krwi w mikroobszarach 1,42 mm<sup>2</sup> badanych biomateriałów po 2 godz. inkubacji z osoczem bogato płytkowym.  
FIG. 7. The platelets number in the micro areas 1.42 mm<sup>2</sup> of tested biomaterials after 2 hours incubation in platelet rich plasma.

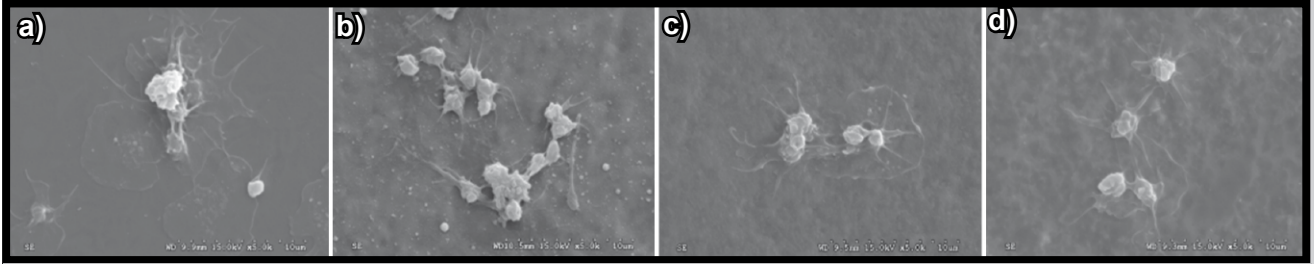


RYS. 8. Liczba agregatów płytkowych w mikroobszarach o powierzchni 1,42 mm<sup>2</sup> badanych biomateriałów po 20 min inkubacji z osoczem bogato płytkowym.  
FIG. 8. The platelets aggregates number in the micro areas 1.42 mm<sup>2</sup> tested biomaterials after 20 min incubation in platelet rich plasma.

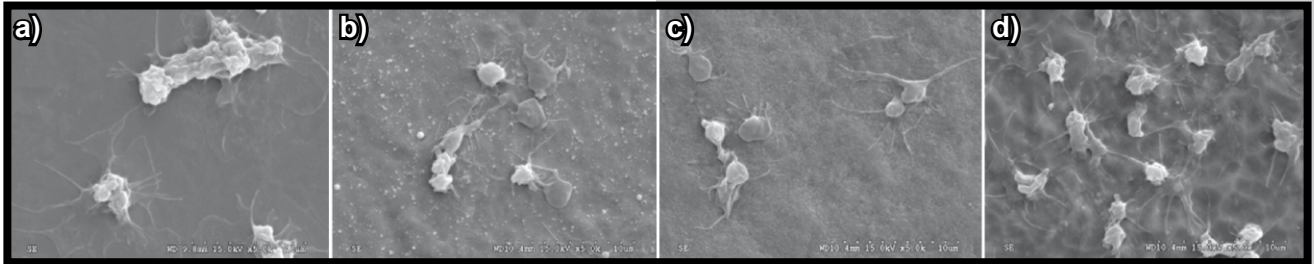


RYS. 9. Liczba agregatów płytkowych w mikroobszarach o powierzchni 1,42 mm<sup>2</sup> badanych biomateriałów po 2 godz. inkubacji z osoczem bogato płytkowym.  
FIG. 9. The platelets aggregates number in the micro areas 1.42 mm<sup>2</sup> tested biomaterials after 2 hours incubation in platelet rich plasma.





**RYS. 10. Morfologia płytek krwi zaadherowanych na badanych biomateriałach sterylizowanych plazmowo w nadtlenu wodoru: a) stop tytanu Ti6Al4V, b) azotek tytanu, c) tlenoazotek tytanu, d) tlenowęgloazotek tytanu.**  
**FIG. 10. Morphology of platelets adhered on the plasma sterilized biomaterials surfaces: a) titanium alloy Ti6Al4V, b) nitriding layer, c) oxynitriding layer, d) carboxynitriding layer.**



**RYS. 11. Morfologia płytek krwi zaadherowanych na badanych biomateriałach sterylizowanych w tlenku etylenu: a) stop tytanu Ti6Al4V, b) azotek tytanu, c) tlenoazotek tytanu, d) tlenowęgloazotek tytanu.**  
**FIG. 11. Morphology of platelets adhered on the gas sterilized biomaterials surfaces: a) titanium alloy Ti6Al4V, b) nitriding layer, c) oxynitriding layer, d) carboxynitriding layer.**

### Trombogenicność powierzchni w warunkach dynamicznych

Badania przeprowadzono dla wszystkich warstw (TiN, TiO<sub>2</sub> i Ti(OCN)) oraz dla stopu tytanu Ti6Al4V, a także dla materiałów referencyjnych: polistyrenu, którego powierzchnię firma DiaMed rekomenduje w metodzie badań urządzenia jako odpowiadającą najlepiej warunkom panującym w pobliżu ścian naczyń tętniczych oraz dla poliuretanu z jakiego aktualnie wytwarzane są pozaustrojowe komory wspomaganie serca.

W badaniach trombogenicności w warunkach dynamicznych zaobserwowano, że największa liczba płytek krwi po ekspozycji krąży w kontakcie z powłokami TiN oraz TiO<sub>2</sub>. Odpowiednio również dla tych dwóch warstw liczba agregatów płytkowych krążących w krwi była najniższa. Warto jednak zauważyć, że chociaż dla warstwy tlenowęgloazotowanej (zewnątrzna strefa warstwy Ti(OCN)) odnotowano wyższą agregację trombocytów, to wszystkie warstwy wytworzone na powierzchni stopu tytanu mają większą liczebność krążących trombocytów i mniejszy udział agregatów płytkowych w porównaniu do wypolerowanego (o najniższej chropowatości – TABELA 1) stopu Ti6Al4V (RYS. 12,13).

Analizie poddano również stopień, w jaki badane powierzchnie aktywowały płytki krwi przepływającej nad powierzchnią. Oznaczano aktywność płytek wyrażaną ekspresją: selektyny-P (RYS. 14) oraz receptora integryny IIb/IIIb (RYS. 15). Najbardziej płytki aktywowała powierzchnia warstwy tlenowęgloazotowanej – Ti(OCN), podczas gdy najslabiej warstwa tlenoazotowana – TiO<sub>2</sub> oraz wypolerowana powierzchnia stopu tytanu.

Dla badań trombogenicności w warunkach dynamicznych dokonano również porównawczej analizy: liczebności płytek krwi i agregatów płytkowych krążących we krwi, płytek krwi i stopnia ich aktywacji (RYS. 16,17,18). Dla lepszego zrozumienia własności trombogenicznych badanych powierzchni biomateriałów przeanalizowano jednoczesność występowania różnych zjawisk odpowiedzialnych za trombogenicność. Między innymi porównano ilość płytek krwi i agregatów płytkowych krążących we krwi po kontakcie z powierzchnią biomateriału z wywołaną jednocześnie aktywacją krwi spowodowaną kontaktem z biomateriałem.

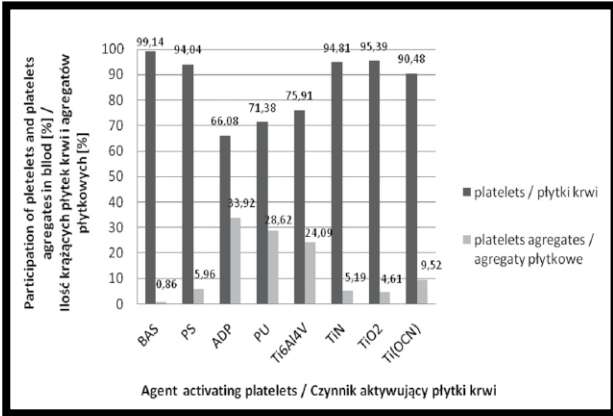
### The dynamic thrombogenicity tests

The dynamic thrombogenicity tests were done for all tested layers (TiN, TiO<sub>2</sub>, Ti(OCN)), titanium alloy Ti6Al4V and reference materials such as polystyrene and polyurethane. Polystyrene is recommended by DiaMed Company as the material which simulates in the best way the physiological conditions in the human arteries. Polyurethane is currently used as the construction material of ventricular assist devices.

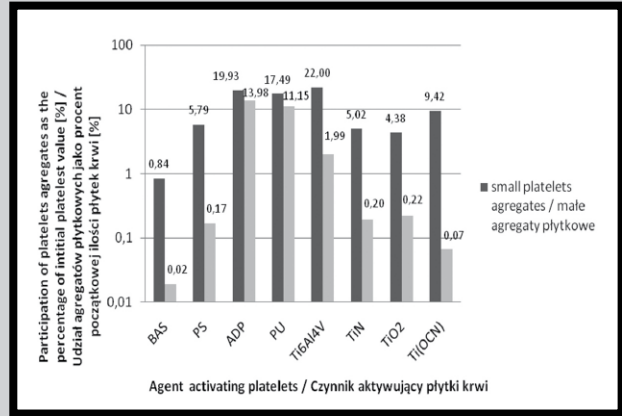
The dynamic thrombogenicity tests showed that the highest platelets number consequently circulate in the blood in contact with nitriding and oxynitriding layers. The number of platelets aggregates observed in the blood after contact with TiN and TiO<sub>2</sub> was the lowest. Although the higher platelets aggregation was observed in the blood after contact with carboxynitriding layers (the external layer area Ti(CON)), the all three diffusive layers developed on the titanium alloy surface have more circulating platelets and lowest contribution in platelets aggregates than polished titanium alloy (with the lowest roughness – TABLE 1, FIG. 12,13).

The platelets activation caused by tested surfaces was investigated by testing the selectin-P (FIG. 14) and receptor GPIIb/IIIa (FIG. 15) expression. Higher platelets activation was observed in the blood after contact with carboxynitriding layer Ti(OCN), whereas the lowest platelets activation was observed in the blood after contact with oxynitriding layer TiO<sub>2</sub> and polished titanium alloy surface.

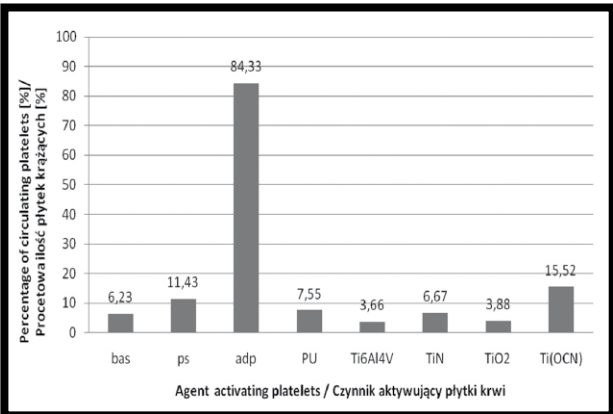
In the dynamic thrombogenicity tests the comparative analysis was done: the number of platelets compared with the number of platelets aggregates circulating in the blood and with the platelets activation (FIG. 16,17,18). For better understanding the thrombogenic properties of tested biomaterials surfaces, the simultaneity of different phenomena responsible for thrombogenicity occurrence was analyzed. Among other things platelets and aggregates number circulating in the blood after contact with biomaterials surface was compared to blood activation due to contact with biomaterial.



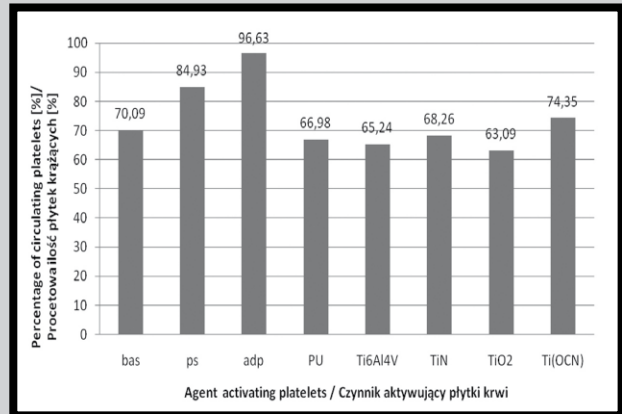
**RYS. 12. Porównanie liczby płytek krwi z liczbą agregatów płytkowych w krwi po ekspozycji dla naprężeń ścinających.**  
**FIG. 12. Platelets and platelets aggregates number circulating in the blood after contact with biomaterials surfaces.**



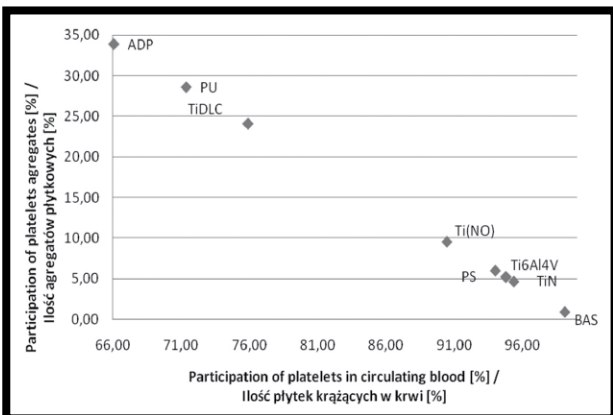
**RYS. 13. Porównanie liczby małych i dużych agregatów płytkowych w krwi po ekspozycji dla naprężeń ścinających.**  
**FIG. 13. Number of small and big platelets aggregates circulating in the blood after contact with biomaterials surfaces.**



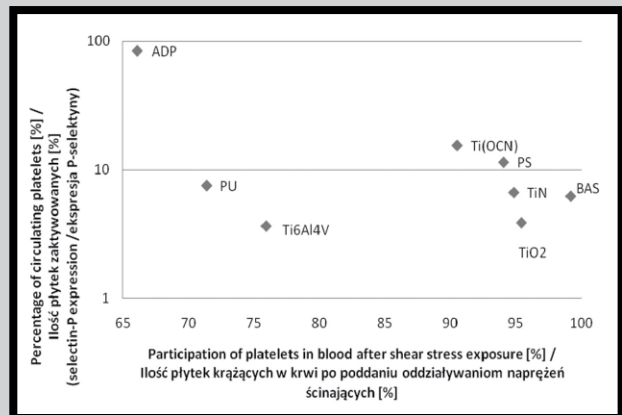
**RYS. 14. Udział procentowy zaktywowanych płytek w krwi krążącej po ekspozycji do naprężeń ścinających, określony na podstawie ekspresji selektyny-P.**  
**FIG. 14. Percentage number of activated platelets in the circulating blood – selectin-P expression.**



**RYS. 15. Udział procentowy zaktywowanych płytek w krwi krążącej po ekspozycji do naprężeń ścinających, określony na podstawie ekspresji receptora GPIIb/IIIa.**  
**FIG. 15. Percentage number of activated platelets in the circulating blood – GPIIb/IIIa expression.**



**RYS. 16. Poziom agregatów płytkowych i płytek krwi krążących we krwi po ekspozycji na naprężenia ścinające.**  
**FIG. 16. Platelets and platelets aggregates circulating in the blood after contact with the biomaterial surface.**



**RYS. 17. Aktywacji płytek (ekspresja selektyny-P) w relacji do liczby płytek krążących we krwi po kontakcie z powierzchnią biomateriału.**  
**FIG. 17. Platelets activation (selectin-P expression) related to platelets number circulating in the blood after contact with the biomaterial surface.**

## Podsumowanie

Badania porównawcze wskazują, że dla uzyskania lepszych właściwości atrombogennych powierzchni wytworzonych biomateriałów korzystniejszą sterylizacją dla warstw tlenoazotowanych –  $\text{TiO}_2+\text{TiN}+\text{Ti}_2\text{N}+\alpha\text{Ti}(\text{N})$  i stopu tytanu Ti6Al4V jest sterylizacja gazowa, a dla warstw azotowanych  $\text{TiN}+\text{Ti}_2\text{N}+\alpha\text{Ti}(\text{N})$  i tlenowęglonozotowanych  $\text{Ti}(\text{OCN})+\text{TiN}+\text{Ti}_2\text{N}+\alpha\text{Ti}(\text{N})$  sterylizacja plazmowa. Takie metody przyczyniają się do mniejszej adhezji i agregacji płytek. Badania na krwi wykazały dobre własności atrombogenne wytworzonych warstw dyfuzyjnych azotowanych – TiN i tlenoazotowanych –  $\text{TiO}_2$  na stopie tytanu Ti6Al4V.

## Podziękowania

Praca została wykonana w ramach projektu rządowego „Polskie Sztuczne Serce” nr 01/WK/P01/001/SPB-PSS/2008.

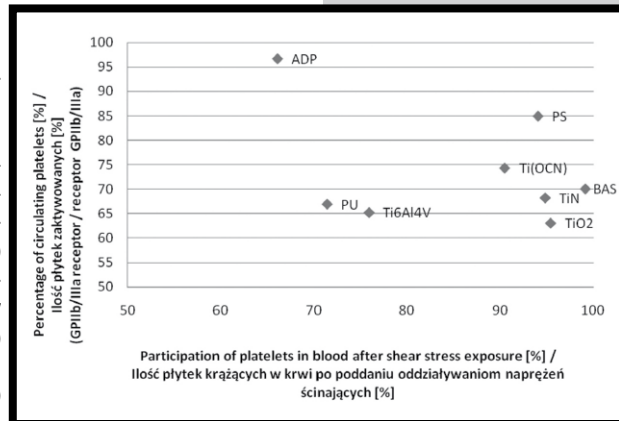
## Piśmiennictwo

- [1] C.Elias, J.Lima, R.Valiev, M.Meyers: Biomedical Applications of Titanium and its Alloys, JOM Journal of the Minerals, Metals and Materials Society, 2008, Volume 60, Number 3, 46-49, DOI: 10.1007/s11837-008-0031-1.
- [2] J.Marciniak, Z.Paszenda: Biotolerancja biomateriałów metalicznych, Spondyloimplantologia zaawansowanego leczenia kręgosłupa System DERO. Red. L.F. Ciupik, D. Zarzycki. Polska Grupa DERO, Stowarzyszenie studiów i badań kręgosłupa, 133-142, 2004.
- [3] M. Textor, C. Sittig, V. Frauchiger, S. Tosatti, D.M. Brunette, Properties and Biological Significance of Natural Oxide Films on Titanium and Its Alloys, „Titanium in Medicine: Material Science, Surface Science, Engineering, Biological Responses and Medical Applications”, Springer Verlag, Heidelberg and Berlin; pp 171-230, 2001.

## Summary

The comparative investigation presented that to obtain better athrombogenic properties of biomaterials surfaces the gas sterilization is more suitable for oxynitriding layer ( $\text{TiO}_2+\text{TiN}+\text{Ti}_2\text{N}+\alpha\text{Ti}(\text{N})$ ) and titanium alloy – Ti6Al4V, and plasma sterilization – for nitriding ( $\text{TiN}+\text{Ti}_2\text{N}+\alpha\text{Ti}(\text{N})$ ) and carboxynitriding layers ( $\text{Ti}(\text{OCN})+\text{TiN}+\text{Ti}_2\text{N}+\alpha\text{Ti}(\text{N})$ ). These sterilization methods contribute to lower platelets adhesion and aggregation.

The blood tests confirmed good athrombogenic properties of developed layers: nitriding – TiN and oxynitriding –  $\text{TiO}_2$  on the titanium alloy Ti6Al4V.



**RYS. 18. Aktywacji płytek (ekspresja receptora GPIIb/IIIa) w relacji do liczby płytek krążących we krwi po kontakcie z powierzchnią biomateriału.**

**FIG. 18. Platelets activation (receptor GPIIb/IIIa expression) related to platelets number circulating in the blood after contact with the biomaterial surface.**

## Acknowledgement

The researches were done as a part of government project “Polish Artificial Heart” number 01/WK/P01/001/SPB-PSS/2008.

## References

- [4] Laczkovics A, Heidt M, Oelert H, Laufer G, Greve H, Pomar JL, et al.: Early clinical experience with the On-X prosthetic heart valve, J Heart Valve Dis 2001;10(1):94-9.
- [5] F.Schoen, J.Titus, G.Lawrie: Bioengineering aspects of heart valve replacement, Annuals of Biomedical Engineering USA, 1982, vol. 10, pp. 97-128.
- [6] T. Borowski, A. Sowińska, M. Ossowski, E. Czarnowska, T. Wierchoń: The process of glow discharge assisted oxynitriding of titanium alloy in aspekt of its application in artificial heart components, Inżynieria Materiałowa 3 (2010) 751-754.