

MARIA SZYMONOWICZ^{1, A-D}, BOGUSŁAWA ŻYWICKA^{1, B, C}, ZBIGNIEW RYBAK^{1, E, F},
AGNIESZKA RUSAK^{1, C}, DOROTA HAZNAR^{2, B, G}, JANUSZ PLUTA^{2, B, G}

Wpływ matryc żelatynowo-alginianowych z mleczanem wapnia na osoczowy układ krzepnięcia po implantacji w tkanki miękkie

Influence of the Gelatin-Alginate Matrixes with Calcium Lactate in Plasma Coagulation System After Implantation in Soft Tissues

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

² Katedra i Zakład Technologii Postaci Leku, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, Wrocław, 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 matryc

Streszczenie

Wprowadzenie. Bioresorbowalne porowate podłoża z kopolimerów są stosowane w inżynierii tkankowej przy hodowli tkanek w warunkach *in vitro*. Zaletą polimerów jest również wytwarzanie z nich termoplastycznych elementów zespalających oraz zdolność do biodegradacji w organizmie. Żelatyna, kolagen, alginiany wchodzi w skład opatrunków służących do miejscowego podawania leku. Podjęte zostały badania nad uzyskaniem porowatej matrycy żelatynowo-alginianowej, która mogłaby znaleźć zastosowanie w leczeniu, m.in. jako nośnik dla leku.

Cel pracy. Ocena wpływu modyfikowanej matrycy żelatynowo-alginianowej na aktywację osoczowego układu krzepnięcia w badaniach *in vivo*.

Materiał i metody. Gąbkę żelatynowo-alginianową sieciowaną jonami wapnia wszczepiono w tkankę mięśniową u szczura. Grupą kontrolną były zwierzęta, którym nie implantowano materiału, ale przeszły procedurę operacyjną. Krew do badania osoczowego układu krzepnięcia pobrano po 1, 2, 3, 5, 7, 10, 14 dobach od zabiegu.

Wyniki. W badaniach osoczowego układu krzepnięcia stwierdzono do 5. doby wydłużenie APTT i skrócenie PT i TT przy niezmienionych wartościach fibrynogenu i liczby krwinek płytkowych. Po 7, 10 i 14 dobach obserwowano wydłużenie APTT przy niezmienionych wartościach PT i TT układu krzepnięcia.

Wnioski. Matryca żelatynowo-alginianowa z jonami wapnia w środowisku biologicznym ulega biodegradacji w tkankach miękkich. Proces ten w początkowym okresie wpływa na aktywację krzepnięcia w układzie wewnątrz- i zewnątrzpo pochodnym. Od 5. do 14. doby obserwowano jedynie aktywację krzepnięcia w układzie wewnątrzpo pochodnym (**Polim. Med. 2013, 43, 3, 159–164**).

Słowa kluczowe: matryca żelatynowo-alginianowa z jonami wapnia, implantacja, parametry osoczowego układu krzepnięcia, aktywacja krzepnięcia.

Abstract

Background. Bioresorbable porous substrates from copolymers have their application in tissue engineering to culture tissues *in vitro*. The advantage of polymers is the production of thermoplastic elements and their ability to biodegrade in a living body. Gelatin, collagen, alginates are part of dressings used for topical administration of the drug. Research was undertaken to achieve a porous gelatin-alginate matrix which could be used in therapy as among others, a carrier for a drug.

Objectives. Evaluation of the impact of modified gelatin-alginate matrix on activation of plasma coagulation *in vivo*.

* Praca została wykonana w ramach prac własnych uczelni – grant nr 1260.

Material and Methods. Gelatin-alginate matrix cross-linked with calcium ions was implanted in the muscle tissue of a rat. The control group constituted animals not implanted with material, but they passed the operating procedure. Blood samples of plasma coagulation test and control group were collected after 1, 2, 3, 5, 7, 10, 14 days of the procedure.

Results. Prolongation of APTT and shortening of PT and TT with the unchanged values of fibrinogen and the count of platelet cells was observed till the 5th day on the basis of the obtained results. Prolongation of APTT with the unchanged values of the remaining parameters of the coagulation system was observed after 7, 10 and 14 days with unchanged values of PT and TT coagulation.

Conclusions. The matrix gelatin-alginate with calcium ions in the biological environment undergoes biodegradation in soft tissues. This process in the initial period influences the activation of the coagulation within the intrinsic and extrinsic system. From the 5th to 14th day the activation of coagulation was observed only in the intrinsic system (*Polim. Med.* 2013, 43, 3, 159–164).

Key words: gelatine-alginate matrixes with calcium ions, implantation, parameters of plasma coagulation system, activation of coagulation.

Spośród licznej grupy materiałów, które wprowadza się w tkanki znaczące miejsce zajmują polimery biodegradowalne. Implanty z polimerów resorbowlanych ulegają degradacji *in vivo* do produktów obojętnych dla organizmu i nie ma konieczności ich usuwania, dlatego obecnie są coraz częściej stosowane w różnych dziedzinach medycyny [1].

Oddziaływanie między implantem a środowiskiem biologicznym oraz kinetyka degradacji i resorpcji są ściśle uzależnione od rodzaju wszczepionego materiału, a tym samym decydują o jego zastosowaniu [1]. Żelatyna i alginian sodu są szeroko stosowanymi, biogodnymi, biodegradowalnymi polimerami stosowanymi w technologii farmaceutycznej [2, 3]. Na bazie wyżej opisanych polimerów w Zakładzie Farmacji Aptecznej Katedry Technologii Postaci Leku UMW opracowano technologię wytwarzania porowatej matrycy żelatynowo-alginiowej, która może być zastosowana zarówno jako materiał podtrzymujący uszkodzone tkanki, jak i nośnik dla substancji leczniczej [2–4]. Na podstawie oceny parametrów farmaceutycznych wytypowano materiały do badań biologicznych *in vitro* [5] i *in vivo* [6]. Matryce złożone tylko z żelatyny i alginianu okazały się łamliwe, twarde i kruche [2–6]. Zastosowanie substancji uelastyczniającej (glicerol) oraz sieciującej (mleczan wapnia) zmieniło znacząco parametry fizykochemiczne matrycy. Dodatek glicerolu spowodował zwiększenie jej gęstości, a jony wapnia usztywnienie struktury [7]. Modyfikacja miała na celu zwiększenie trwałości materiału w środowisku biologicznym. W badaniach *in vitro* matryce poddano czasowemu kontaktowi z krwią w celu określenia wzajemnych oddziaływań między materiałem a komórkami oraz białkami krwi [8]. W przeprowadzonych badaniach nie stwierdzono działania hemolitycznego oraz zmian morfotycznych w obrazie granulocytów, erytrocytów i płytek krwi. Matryca modyfikowana jonami wapnia w większym stopniu powoduje aktywację wewnątrz- i zewnątrzpoходnym układzie krzepnięcia (wydłużony APTT i PT) bez wpływu na zmianę stężenia fibrynogenu. Zmiany te są wynikiem wpływu składników materiału, przemiany strukturalnej materiału podczas czasowego kontaktu z krwią [8]. Matrycę modyfikowaną wszczepiono

w tkanki miękkie w celu określenia stopnia degradacji i resorpcji oraz procesu gojenia uszkodzonych tkanek, wpływu na morfologiczne parametry krwi [9] oraz na osoczowe parametry układu krzepnięcia krwi.

Celem pracy była ocena wpływu matrycy żelatynowo-alginiowej z węglanem wapnia na aktywację osoczowego układu krzepnięcia w badaniach *in vivo*.

Material i metody

Do badań użyto matryce żelatynowo-alginiowej o strukturze gąbki, otrzymane metodą liofilizacji piany powstałej przez spienienie mieszaniny jałowych roztworów żelatyny (20%), alginianu sodu (4%) i glicerolu w ilości 3% masy żelatyny i poddane sieciowaniu za pomocą 4% roztworu mleczanu wapnia. Gąbki, wszczepy zostały przygotowane w kształcie walców o średnicy 0,5 cm i wysokości 4 mm.

Badania przeprowadzono na szczurach szczepu Wistar, samcach w wieku 4 miesięcy i o wadze 350 g. Zabiegi i badania diagnostyczne krwi oraz ocenę histologiczną wykonano w Zakładzie Chirurgii Eksperymentalnej i Badania Biomateriałów UMW (zgoda Lokalnej Komisji nr 41/40/2004). Szczury przebywały w warunkach chowu laboratoryjnego [10].

Zwierzęta znieczulono ketaminą i unieruchomiono w pozycji brzusznej na specjalnym stoliku operacyjnym. Skórę i tkankę podskórną przecięto w linii środkowej grzbietu na długości około 3 cm, po lewej oraz po prawej stronie odcinka piersiowego kręgosłupa. Następnie przecięto powięź i na tępo preparowano mięśnie. W wytworzonych kieszeniach wszczepiono gąbkę. Mięśnie zaszywano pojedynczym szwem Dexon 3/0, a ranę skóry szwem Amifil M3/0. Grupą porównawczą operacyjną (kontrola) były zwierzęta, którym nie wszczepiono materiału, ale przeszły procedurę operacyjną [11, 12].

Sekcje zwierząt wykonano po 24 h, 48 h oraz po 3, 5, 7 i 14 dniach. W czasie badań pobrano krew i tkankę mięśniową wraz ze wszczepem [12, 13].

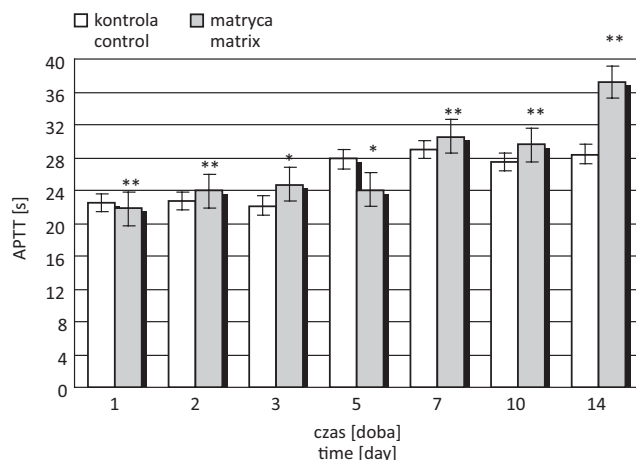
Krew do badań pobrano z serca szczurów. Badania osoczowego układu krzepnięcia wykonano w osoczu cytrynianowym. Osocze otrzymano z krwi pobranej na 0,11 mol/l roztworu cytrynianu sodu i odwirowa-

nej ($1500 \times q/10$ min). Aktywację układu krzepnięcia, zależnego od czynników kontaktu (układ wewnętrzz-pochodny) oceniono, oznaczając czas częściowej trombo-plastyny po aktywacji (APTT). Aktywację krzepnięcia, zależną od tromboplastyny tkankowej (układ zewnątrz-pochodny), oznaczono testem protrombinowym (PT). Pomiarem charakteryzującym obydwa układy aktywacji protrombiny był test TT (czas trombinowy, pomiar przejścia fibrynogenu w fibrynę). Oznaczenia wykonano na aparacie ACL 9000, firmy Beckman. Procedury oznaczeń są zgodne z metodami zawartymi w instrukcji do aparatu [14]. Liczbę krwinek płytkowych oznaczono we krwi wersenianowej na aparacie hematologicznym ABX Cobas Micros 40 firmy La Roche [15].

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

Wyniki

Średnie wartości wybranych parametrów osoczo-wego układu krzepnięcia po 1, 2, 3, 7, 10 i 14 dobach od implantacji matrycy żelatynowo-alginiowej z jonami wapnia w tkankę mięśniową oraz dla grupy kontrolnej (operacyjnej) podano na ryc. 1–5.



Ryc. 1. Czas częściowej tromboplastyny po aktywacji (APTT) we krwi kontrolnej oraz po implantacji matrycy żelatynowo-alginiowej z jonami wapnia

Fig. 1. Activated partial thromboplastin time (APTT) in the control blood and after implantation of gelatine-alginate matrix with calcium ions

* $p < 0,05$.

* $p < 0,05$.

** $p < 0,01$ – poziomy istotności względem grupy kontrolnej.

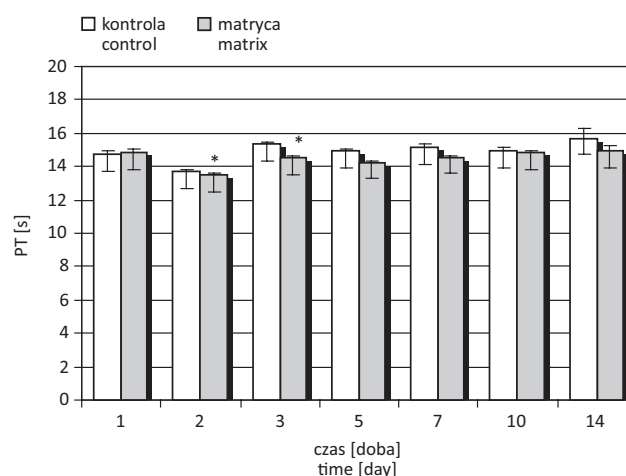
** $p < 0,01$ – differences in relation to the control group.

W początkowym czasie obserwacji, po 24 godzinach, stwierdzono istotne ($p < 0,01$) skrócenie APTT ($21,73 \pm 0,05$ s) w porównaniu do wartości kontrolnej ($22,50 \pm 0,10$ s). Po 2 i 3 dobach APTT ($23,96 \pm 0,06$ s i $24,70 \pm 0,40$ s) była istotnie wydłużona ($p < 0,05$, $p < 0,01$) w stosunku do wartości kontrolnej ($22,70 \pm 0,20$ s). Po 5 dobach od implantacji stwierdzono natomiast istotne ($p < 0,05$) skrócenie APTT ($24,10 \pm 0,12$ s). Po 7, 10 i 14 dobach wartości APTT były istotnie wydłużone ($p < 0,01$) (odpowiednio: $30,56 \pm 0,15$ s, $29,56 \pm 0,10$ s, $37,16 \pm 0,45$ s) w porównaniu do kontroli (odpowiednio: $28,96 \pm 0,06$ s, $27,46 \pm 0,21$ s, $28,40 \pm 0,55$ s) (ryc. 1).

Wartości PT po 2 dobach ($13,70 \pm 0,10$ s) i po 3 dobie ($15,36 \pm 0,15$ s) były istotnie skrócone ($p < 0,05$) w porównaniu do kontroli (odpowiednio: $13,70 \pm 0,01$ s i $15,36 \pm 0,15$ s). Po 5, 7, 10 i 14 dobach stwierdzono nieistotne ($p > 0,05$) skrócenie PT (odpowiednio: $14,27 \pm 0,06$ s, $14,56 \pm 0,08$ s, $14,83 \pm 0,15$ s i $14,93 \pm 0,35$ s) w stosunku do kontroli (odpowiednio: $14,96 \pm 0,06$ s, $15,16 \pm 0,15$ s, $14,96 \pm 0,15$ s i $15,70 \pm 0,60$ s) (ryc. 2).

Wartości TT po 1, 2, 3 i 5 dobach były istotnie ($p < 0,05$) skrócone (odpowiednio: $24,86 \pm 0,65$ s, $24,96 \pm 0,85$ s, $27,70 \pm 0,50$ s i $29,20 \pm 0,30$ s) w stosunku do kontroli (odpowiednio: $26,86 \pm 0,15$ s, $28,66 \pm 0,35$ s, $29,06 \pm 0,33$ s i $30,90 \pm 0,20$ s). Po 7, 10 i 14 dobach wartości TT (odpowiednio: $30,90 \pm 0,10$ s, $29,75 \pm 0,70$ s, $30,73 \pm 0,16$ s) były w zakresie wartości grupy kontrolnej (odpowiednio: $30,50 \pm 0,70$ s, $30,45 \pm 0,63$ s, $31,20 \pm 0,20$ s) (ryc. 3).

Stężenie fibrynogenu po 1, 2, 3, 5, 7, 10, 14 dobach obserwacji (odpowiednio: $5,20 \pm 0,33$ g/l, $3,97 \pm 0,16$ g/l, $3,37 \pm 0,36$ g/l, $2,38 \pm 0,39$ g/l, $1,86 \pm 0,12$ g/l, $1,76 \pm 0,09$ g/l, $1,66 \pm 0,12$ g/l) było porównywalne z wartościami w grupie

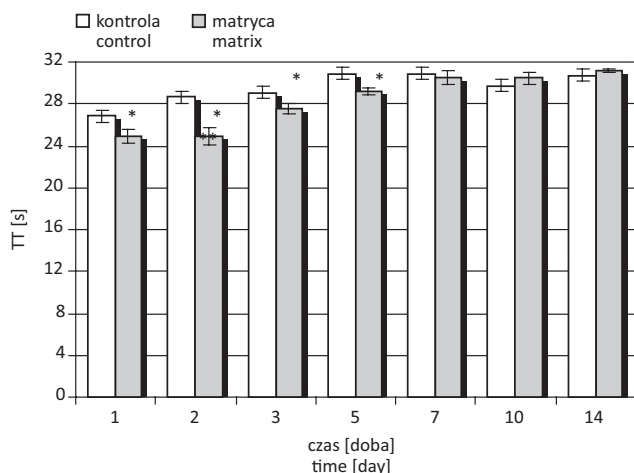


Ryc. 2. Czas protrombinowy (PT) we krwi kontrolnej oraz po implantacji matrycy żelatynowo-alginiowej z jonami wapnia

Fig. 2. Prothrombin time (PT) in the control blood and after implantation of gelatine-alginate matrix with calcium ions

* $p < 0,05$ – poziom istotności względem grupy kontrolnej.

* $p < 0,05$ – difference in relation to the control group.

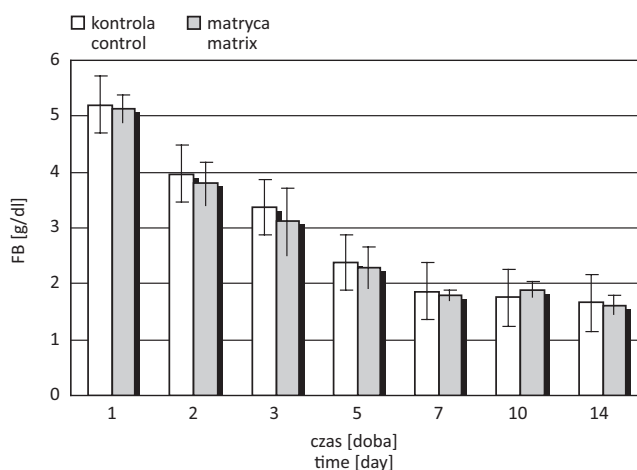


Ryc. 3. Wartości czasu trombinowego (TT) we krwi kontrolnej oraz po implantacji matrycy żelatynowo-alginianowej z jonami wapnia

Fig. 3. Prothrombin time (TT) in the control group blood and after implantation of gelatine-alginate matrixes with calcium ions

* $p < 0,05$ – poziom istotności względem grupy kontrolnej.

* $p < 0,05$ – difference in relation to the control group.

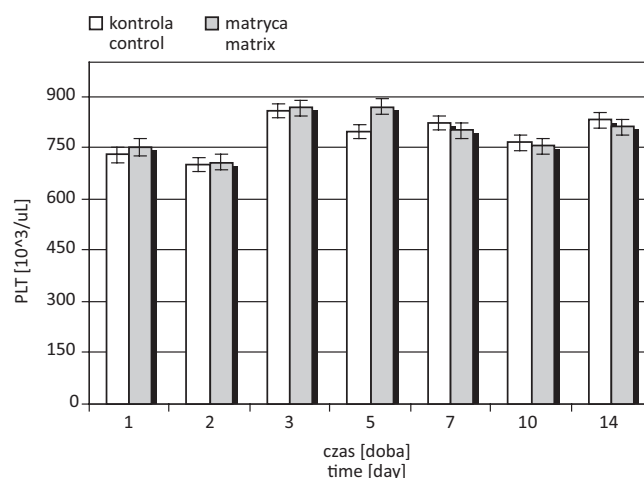


Ryc. 4. Stężenie fibrynogenu (FB) we krwi kontrolnej oraz po implantacji matrycy żelatynowo-alginianowej z jonami wapnia

Fig. 4. Fibrinogen concentration (FB) in the control blood and after implantation of gelatine-alginate matrix with calcium ions

kontrolnej (odpowiednio: $5,13 \pm 0,24$ g/l, $3,79 \pm 0,38$ g/l, $3,11 \pm 0,60$ g/l, $2,28 \pm 0,37$ g/l, $1,79 \pm 0,09$ g/l, $1,89 \pm 0,14$ g/l, $1,62 \pm 0,14$ g/l) (ryc. 4).

Liczba krwinek płytkowych we krwi po implantacji była zbliżona do wartości grup kontrolnych. Wartości PLT w grupie badanej były w zakresie od $729,25 \pm 12,84 \times 10^3/\mu\text{l}$ do $856,72 \pm 50,51 \times 10^3/\mu\text{l}$, a w grupie kontrolnej w zakresie od $707,50 \pm 16,84 \times 10^3/\mu\text{l}$ do $754,25 \pm 38,34 \times 10^3/\mu\text{l}$ (ryc. 5).



Ryc. 5. Liczba krwinek płytkowych (PLT) we krwi kontrolnej oraz po implantacji matrycy żelatynowo-alginianowej z jonami wapnia

Fig. 5. Blood platelets count (PLT) in the control blood and after implantation of gelatine-alginate matrix with calcium ions

Omówienie

Zastosowanie implantów z naturalnych i syntetycznych polimerów stwarza nowe możliwości rozwoju jako nośników systemów terapeutycznych. Usieciowane polimery stosowane w regeneracji tkanek oraz jako nośniki związków aktywnych to wciąż aktualny kierunek badań. Praca eksperymentalna z zakresu wykorzystania gąbek żelatynowych w regeneracji zerwanego ścięgna autorstwa Nicholasa ukazała się już w latach 40. XX w. [16]. W późniejszych latach gąbka żelatynowa impregnowana glikolidem polilaktydu z paklitakselem (PLGA-PTX) została wykorzystana jako nośnik cytostatyku przeciwko przerzutom raka płuc w modelu szczurzym i wykazano zmniejszenie przerzutów o 80% w stosunku do kontroli. Ten rezultat może być związany z lepszą dystrybucją PTX do układu limfatycznego [17]. Hemostatyczna, resorbowalna gąbka żelatynowa wzbogacona 5-fluorouracylem (5-FU-HAGS) hamowała wzrost guzów nowotworowych w modelu mysim raka jelita. Sukcesywnie uwalniany cytostatyk działał skuteczniej niż podawany przez iniekcję [18]. Staniszevska-Kuś et al. [19] w badaniach materiałów przeznaczonych do hemostazy miejscowej stwierdzili przydatność opatrunku żelatynowego Spongostan do zaopatrywania uszkodzonych i krwawiących ran narządów miękkich. Szymonowicz et al. [20] wykazali, że gąbka żelatynowa poddana czasowemu kontaktowi z osoczem krwi nie zmienia aktywności białek układu krzepnięcia i fibrynolizy. Implantacja gąbki żelatynowej do mięśni grzbietowych szczura pozwoliła na badania trójwymiarowej architektury powstających naczyń krwionośnych [21]. Resorbowalna gąbka żelatynowa Gelfoam® powodowała zatamowanie krwawie-

nia, przyspieszała tworzenie się skrzepów fibrynowych oraz powodowała mniejsze uszkodzenia płytek krwi. Badania biomateriału przeprowadzone przez Roslindo et al. na modelu szczurzym wykazały korzystny wpływ gąbki na proces regeneracji kości piszczelowej, przy łagodnej odpowiedzi zapalnej [22]. Wpływ wielkości porów gąbek na bazie kopolimeru glikolidu z L-laktydem (PGLA) na regenerację tkanki mięśniowej przedstawiono w pracy Manaszek i Pamuły [23]. Shapiro et al. [24] i Choi et al. [25] wykazali, że gąbki alginianowe i żelatynowo-alginianowe mogą mieć zastosowanie jako swoisty nośnik w transplantologii komórek. Proces oddziaływania między środowiskiem biologicznym a implantem jest ściśle uzależniony od jego charakteru.

W doświadczeniu własnym użyto implantów w postaci gąbek żelatynowo-alginianowych z mleczanem wapnia i badano w warunkach *in vivo* w celu określenia ich wpływu na osoczowy układ krzepnięcia po wszczepieniu w tkanki miękkie.

Oceniając parametry krzepnięcia krwi, stwierdzono aktywację krzepnięcia wyrażającą się skróceniem APTT (1, 5 doba) oraz wydłużeniem APTT (2 i 3 i 5 do 14. doby), skróceniem PT (2, 3 doba) oraz skróceniem TT (do 5 doby) przy niezmiennych wartościach fibrynogenu i liczby krwinek płytkowych. Aktywacja krzepnięcia w układzie wewnątrzpochodnym oraz zewnątrzpochodnym wystąpiła równocześnie do 3 doby po implantacji, następnie obserwowano jedynie aktywację w układzie wewnątrzpochodnym. Aktywację, pobudzenie (skrócone TT) procesu konwersji fibrynogenu w fibrynę bez istotnego zmniejszenia stężenia fibrynogenu obserwowano do 5 doby. Stwierdzone zmiany w osoczym układzie krzepnięcia nie przekraczają zakresu wartości referencyjnych oznaczonych wskaźników (APTT: 29,20 s – 36,50 s – 43,80 s), (PT: 10,60 s – 15,80 s), (TT: 10,30 s – 12,50 s – 15,50 s), (Fb: 0,30 g/l – 6,00 g/l).

Na uzyskane wartości oznaczonych wskaźników krwi miał niewątpliwie wpływ proces degradacji, resorpcji matrycy zachodzący w tkance mięśniowej. W badaniach *in vitro* w kontakcie z krwią matryc z jonami wapnia Szymonowicz et al. [8] stwierdzili również aktywację układów krzepnięcia. Wyniki badań korelują z wynikami otrzymanymi po implantacji.

W badaniach histologicznych gąbek żelatynowo-alginianowych z mleczanem wapnia Szymonowicz, Żywicka et al. [9] wykazali, że stopniowa degradacja w czasie, fragmentacja, zmniejszenie objętości i zmiana gęstości gąbek miały znaczący wpływ na środowisko

tkankowe. Zmiany struktury matrycy są następstwem jej oddziaływania ze środowiskiem tkankowym oraz procesów chemicznych związanych z jej degradacją. Matryca z jonami wapnia wywołała szybszą i intensywniejszą odpowiedź tkankową. Proces ten jest intensywniejszy w początkowym czasie obserwacji.

W przeprowadzonych badaniach *in vivo* gąbek żelatynowo-alginianowych z jonami wapnia stwierdzono korelację między wynikami badań diagnostycznych krwi a oceną histologiczną tkanek miękkich. Zmiany wartości wskaźników osocznego układu krzepnięcia oraz parametrów hematologicznych stwierdzonych w badaniach Szymonowicz et al. [9] obserwowano do 5 doby po implantacji. Autorzy w tym czasie stwierdzili nasilony proces zapalny, fazę wysiękową trwającą do 3 doby, w fazie proliferacyjnej gąbki ulegały otoczeniu i przerośnięciu tkankami biorcy. Obserwowane zmiany wokół implantu mogą mieć wpływ na zmiany ilościowe parametrów diagnostycznych krwi. Drobne pozostałości pofragmentowanych gąbek otoczone i przerośnięte tkankami biorcy były widoczne do 14 dnia obserwacji. Proces regeneracji i reparacji w tkance mięśniowej w obecności matrycy modyfikowanej przebiegał szybciej, odtwarzając tkankę łączną wraz z naczyniami oraz ze zmniejszeniem pola operacyjnego w porównaniu do matryc żelatynowo-alginianowych niesieciowanych jonami wapnia [6].

Badana matryca w postaci gąbki żelatynowo-alginianowej z jonami wapnia i glicerolem w badaniach *in vitro* [8] i *in vivo* [9] spełnia kryteria norm PN-EN 10993 ISO 6, 4 i 11 [12, 13, 26] dotyczących wymagań stawianych materiałom przeznaczonym do bezpośredniego, czasowego kontaktu z tkankami. Przeprowadzone badania i otrzymane wyniki wybranych wskaźników diagnostycznych krwi [8] oraz ocena histologiczna tkanek [9] sugerują możliwość wykorzystania materiału zarówno do regeneracji tkanki mięśniowej, jak również jako nośniki leku, który spełniałby rolę implantacyjnych systemów terapeutycznych.

Podsumowując, można stwierdzić, że: matryca żelatynowo-alginianowa z jonami wapnia wszczepiona w tkanki miękkie wpływa na aktywację osocznego układu krzepnięcia; zaraz po implantacji zaobserwowano aktywację krzepnięcia w układzie wewnątrz- i zewnątrzpochodnym, aktywację krzepnięcia tylko w układzie wewnątrzpochodnym po 120 h od implantacji; aktywację układu trombinowego stwierdzono do 120 h od implantacji przy niezmiennych wartościach stężenia fibrynogenu oraz liczbie krwinek płytkowych.

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] Pluta J., Haznar D.: Resorbable polymeric sponges as drug carriers the therapeutic substance. Part 1. Gelatin sponges. Polim. Med. 2001, 31, 1–2, 18–26.
- [3] Pluta J., Haznar D.: Resorbable polymeric sponges as drug carriers the therapeutic substance. Part 2. Gelatin sponges. Polim. Med. 2001, 31, 3–4, 16–24.

- [4] **Pluta J., Haznar D.:** The effect of composition upon the physical and chemical properties of biodegradable gelatin polymer matrixes. *Polim. Med.* 2002, 32, 3–4, 11–19.
- [5] **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.
- [6] **Pluta J., Haznar D., Owczarek H., Żywicka B., Szymonowicz M., Pielka S., Solski L.:** Gelatinous-alginate sponge as the drug delivery for implantation. *Biomaterials in Regeneration Medicine. Proceedings of the International Conference Vienna, October 22–23, Proceedings 2006*, 183–187.
- [7] **Pluta J., Haznar D.:** Properties and active substance release kinetics from gelatin-alginate matrixes. *Polim. Med.* 2006, 36, 3, 16–24.
- [8] **Szymonowicz M., Pielka S., Haznar D., Pluta J.:** Studies of reaction of gelatin-alginate matrixes on morphotic elements and blood proteins. *Ing. Biomater.* 2007, 69–72, 10, 76–81.
- [9] **Szymonowicz M., Żywicka B., Pielka S., Solski L., Haznar D., Pluta J.:** Influence of the gelatin-alginate matrixes with calcium lactate for the blood parameters soft and tissue reaction. *International Conference (Bio) Degradable Polymers from renewable Resources. Vienna Austria, November 18–21, 2007, Proceedings 2008*, 155–161.
- [10] PN-EN ISO 10993-2:2005. Biologiczna ocena wyrobów medycznych – Część 2: Wymagania dotyczące postępowania ze zwierzętami.
- [11] PN-EN ISO 10993-12:2005. Biologiczna ocena wyrobów medycznych. Część 12: Przygotowanie próbki i materiały odniesienia.
- [12] PN-EN ISO 10993-6:2007. Biologiczna ocena wyrobów medycznych. Część 6: Badania miejscowej reakcji po implantacji.
- [13] PN-EN ISO 10993-4:2003. Biologiczna ocena wyrobów medycznych. Część 4: Wybór badań dla interakcji z krwią.
- [14] ACL 9000/10000 System Operator's Manual Text Part No 190834-2 Rev.02. February 2003. Instrumentation Laboratory.
- [15] ABX Micros Cobas. Instrukcja obsługi aparatu. Warszawa 1999.
- [16] **Nichols H.M.A.:** Discussion of tendon repair with clinical and experimental data on the use of gelatin sponge. *Ann. Surg.* 1949, 223–234.
- [17] **Liu J., Meisner D., Kwong E., Wu X.Y., Johnston M.R.:** Translymphatic Chemotherapy by Intrapleural Placement of Gelatin Sponge Containing Biodegradable Paclitaxel Colloids Controls Lymphatic Metastasis in Lung Cancer. *Cancer Res.* 2009, 69, 3, 1174–1181.
- [18] **Sun W., Chen Y., Yuan W.:** Hemostatic absorbable gelatin sponge loaded with 5-fluorouracil for treatment of tumors. *Int. J. Nanomed.* 2013, 8, 1499–1506.
- [19] **Staniszewska-Kuś J., Rutowski R., Kratochwil J., Paluch D., Szymonowicz M., Solski L., Żywicka B.:** Comparative study of topical hemostatic agents. *Ing. Biomater.* 1998, 1, 17–20.
- [20] **Szymonowicz M., Kratochwil J., Rutowski R., Staniszewska-Kuś J., Paluch D., Solski L., Żywicka B.:** Evaluation of the influence of topical haemostatics materials on coagulation and fibrinolysis parameters. *Ing. Biomater.* 1999, 2, 45–52.
- [21] **Hashizume H., Ushiki T.:** Three-dimensional cytoarchitecture of angiogenic blood vessel in a gelatin sheet implanted in rat skeletal muscular layers. *Arch. Histol. Cytol.* 2002, 65, 347–357.
- [22] **Roslindo E.B., Viola N.V., Gaspar A.M.M.:** Effects of fibrin sealer and resorbable gelatin on the repair of osseous defects in rat tibia. *Braz. Oral Res.* 2007, 21, 3, 222–227.
- [23] **Menaszek E., Pamuła E.:** Wpływ wielkości porów resorbowalnych gąbek PGLA na odpowiedź tkankową. *Badania in vivo. Ing. Biomater.* 2005, 47–53, 221–223.
- [24] **Shapiro L., Cohen S.:** Novel alginate sponges for cell culture and transplantation. *Biomater.* 1997, 18, 8, 583–590.
- [25] **Choi Y.S., Hong S.R., Lee Y.M., Song K.W., Park M.H., Nam Y.S.:** Study on gelatin-containing artificial skin: I. Preparation and characteristics of novel gelatin-alginate sponge. *Biomater.* 1999, 20, 5, 409–417.
- [26] PN-EN ISO 10993-11 (2000). Biologiczna ocena wyrobów medycznych. Część 11: Badania toksyczności ogólnoustrojowej.

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: 5.09.2013 r.

Zaakceptowano do druku: 5.09.2013 r.

Received: 1.06.2013

Revised: 5.09.2013

Accepted: 5.09.2013