

BADANIA DZIAŁANIA CYTOTOKSYCZNEGO MEMBRAN CHITOZANOWYCH PRZEZNACZONYCH NA OPATRUNKI

ZOFIA MODRZEJEWSKA¹, DANUTA PALUCH²

¹ POLITECHNIKA ŁÓDZKA,
WYDZIAŁ INŻYNIERII PROCESOWEJ I OCHRONY ŚRODOWISKA,
UL. WÓLCZAŃSKA 213, 90-924 ŁÓDŹ

² ZAKŁAD CHIRURGII EKSPERYMENTALNEJ I BADANIA BIOMATERIAŁÓW
AKADEMII MEDYCZNEJ WE WROCŁAWIU,
UL. PONIATOWSKIEGO 2, 50-326 WROCŁAW

Streszczenie

W pracy przedstawiono badania dotyczące cytotoksycznego działania hydrożelowych membran chitozanowych wytwarzanych metodą inwersji faz. Hydrożelowe membrany stanowiąc mogą potencjalny materiał na opatrunki. Badania przeprowadzono na referencyjnej linii komórkowej, fibroblastach mysich 3T3/Balb. Membrany chitozanowe po 24, 48 i 72 h kontaktu, nie wykazują działania toksycznego. Plastyfikacja membran w glicerynie wpływa niekorzystnie przeżywalność komórek.

Słowa kluczowe: hydrożel, membrana, działanie cytotoksyczne

[Inżynieria Biomateriałów, 103, (2011), 23-28]

Wstęp

W technologii tzw. nowej generacji opatrunków istotne znaczenie zajmują hydrożele. Spełniają one podstawowe wymagania stawiane opatrunkom najwyższej 3 klasy. Zgodnie z nimi opatrunek powinien wykazywać dużą chłonność, zatrzymywać wydzielinę wraz z zakażkami, stanowić barierę zewnętrzną dla drobnoustrojów oraz przepuszczać gazy i parę wodną, nie może podrażniać rany i reagować z substancjami stosowanymi miejscowo, powinien utrzymywać odpowiednią temperaturę rany (zbliżoną do temperatury ciała), a ponadto być łatwy w użyciu.

Duża popularność matryc hydrożelowych wynika z ich korzystnych własności a mianowicie: obecności wody w strukturze, biogodności i biodegradowalności. Preferowana w leczeniu ran wilgotna terapia przyspiesza bowiem ziarninowanie, angiogenezę i reepitalizację. Czas gojenia rany leczonej w wilgotnym środowisku jest krótszy o ok. 50%. Hydrożele wytwarzają w obszarze rany środowisko zbliżone do fizjologicznego, pobudzając naturalne zdolności komórek do proliferacji i odbudowy uszkodzonej tkanki. Do wytwarzania hydrożeli wykorzystuje się polimery naturalne (agar, żelatyna, pektyna) i syntetyczne poli(alkohol winylowy), poli(winylopirolidon), poli(kwas akrylowy), poli(glikol etylenowy) [1-7].

Duże zainteresowanie budzi również pochodna chityny - chitozan. Chityna (N-acetylo D-glukozaamina), jest po celulozie najbardziej rozpowszechnionym polimerem w przyrodzie. Z uwagi jednak na trudną rozpuszczalność jej zastosowanie jest ograniczone. Stąd zainteresowanie jej pochodną zwaną chitozanem. Chitozan powstaje przez hydrolizę grup acetyloaminowych.

INVESTIGATION OF THE CYTOTOXIC ACTIVITY OF CHITOSAN MEMBRANES TO BE USED AS DRESSING

ZOFIA MODRZEJEWSKA¹, DANUTA PALUCH²

¹ TECHNICAL UNIVERSITY OF LODZ,
FACULTY OF PROCESS AND ENVIRONMENTAL ENGINEERING,
UL. WÓLCZAŃSKA 213, 90-924 ŁÓDŹ, POLAND

² WROCLAW MEDICAL UNIVERSITY,
DEPARTMENT OF EXPERIMENTAL SURGERY
AND BIOMATERIALS RESEARCH,
UL. PONIATOWSKIEGO 2, 50-326 WROCŁAW, POLAND

Abstract

Investigations of cytotoxic activity of chitosan hydrogel membranes produced by the phase inversion method are presented in the paper. Hydrogel membranes can be used potentially as a dressing material. Experiments were carried out on a reference cell line, mouse fibroblasts Balb/C 3T3. Chitosan membranes after 24, 48 and 72 h exposure did not reveal any toxic activity. Plastification of the membranes in glycerin had a negative effect on cell survival.

Keywords: hydrogel, membrane, cytotoxicity

[Engineering of Biomaterials, 103, (2011), 23-28]

Introduction

In the so-called new-generation dressing technology, hydrogels occupy an important place. They meet basic requirements which the highest 3rd class dressings should satisfy. According to these requirements, dressings should have high absorbability towards wound exudate and microbes, constitute an external barrier for microorganisms and should be permeable for gases and water vapor. They cannot irritate wound or react with locally administered substances. They should retain appropriate wound temperature (close to body temperature), and finally, they should be easily applied.

Great popularity of hydrogel matrices is a result of their advantageous properties, namely the presence of water in the structure, biocompatibility and biodegradability. Wet therapy preferred in wound healing enhances growth of granulation tissue, angiogenesis and reepitalization. The time of wet wound healing is shortened by about 50%. In the wound region hydrogels form an environment similar to the physiological one, stimulating natural cell ability to proliferate and reconstruct damaged tissues. Natural (agar, gelatin, pectin) and synthetic (polyvinyl alcohol, polyvinylpyrrolidone, polyacrylic acid, polyethylene glycol) polymers are used for hydrogel production [1-7].

Chitin derivative, chitosan, arouses also significant interest. After cellulose, chitin (N-acetyl-D-glucosamine) is the most popular polymer in nature. However, due to hampered solubility, its application is limited. This is why its derivative called chitosan appears so interesting. Chitosan is formed as a result of hydrolysis of acetylamino groups. The presence of amino groups in the molecule causes that this polymer has better solubility and can be transformed into useful forms (microspheres, membranes, sponges, hydrogels).

Obecność w cząsteczce grup aminowych powoduje, że jest polimerem o lepszej rozpuszczalności i istnieje możliwość przeprowadzenia go w formy użyteczne (mikrosfery, membrany, gąbki, hydrożele). Z wielu badań na zwierzętach wiadomo, że chitozan przyspiesza gojenie ran poprzez: zwiększenie napływu do miejsca zakażenia komórek fagocytujących (granulocyty segmentowane i makrofagi), stymulację migracji i proliferacji komórek naczyń śródbłonna i fibroblastów, a według niektórych badaczy również keratynocytów. Wykazano również, że chitozan działa statycznie, a nawet bójczo na komórki bakterii oraz grzybów drożdżoidalnych. Hydrożele chitozanowe wytwarzane są metodą inwersji faz poprzez neutralizację soli chitozanu w zasadowym roztworze wodnym bądź wodno-alkoholowym, w układzie polikation (sól chitozanu) – polianion (tri, heksaforan sodu, alginian sodu,) oraz żele formujące się w fizjologicznej temperaturze ciała ludzkiego (przy użyciu β -glicerofosforanu sodu, polialkoholu winylowego bądź wykorzystując aktywność enzymatyczną ureazy w temperaturze 37–40°C). W otrzymane struktury wprowadzać można dodatkowe środki. Obecność grup –OH i NH_2 dzięki którym dane środki są unieruchamiane powoduje stabilność układu uzależnioną od warunków, w których się znajduje (np. pH, temperatura), co z kolei umożliwia kontrolowaną desorpcję unieruchomionych środków. Hydrożele chitozanowe badane są w kierunku wykorzystania ich jako nośniki leków, opatrunki (w tym również opatrunki hybrydowe zawierające wybrane środki farmakologiczne np. przeciwbólowe, antybiotyki czy inne wspomagające proces gojenia rany) oraz scaffoldy do hodowli komórkowej [8–22]. Wykorzystanie hydrożeli w inżynierii biomedycznej wymaga określenia w pierwszym rzędzie ich własności cytotoksycznych.

W pracy przedstawiono badania działania cytotoksycznego membran chitozanowych wytwarzanych metodą inwersji faz.

Material

Do badań cytotoksyczności wytypowano hydrożelowe membrany chitozanowe utworzone metodą inwersji faz z chitozanu o stopniu deacetylacji SD = 83% i 97%. Te ostatnie poddano dodatkowo plastyfikacji w 20% roztworze wodnym glicerolu. W dalszej części pracy przyjęto następujące oznaczenia:

- hydrożele chitozanowe z chitozanu o stopniu deacetylacji 83%; - (b)
- hydrożele chitozanowe z chitozanu o stopniu deacetylacji 97%; - (c)
- hydrożele chitozanowe z chitozanu o stopniu deacetylacji 97% plastyfikowane w glicerynie - (d)

Membrany utworzono z octanu chitozanu. Stężenie polimeru w roztworze wynosiło 8%. Roztwór soli chitozanowej rozprowadzono na wyzmiomowanej płaskiej powierzchni za pomocą aplikatora o wysokości szczeliny 0,8 mm, po czym bezpośrednio płytkę umieszczano w kąpeli neutralizującej (10% roztworze wodnym NaOH). Czas trwania neutralizacji wynosił 24 h. Następnie próbki odmywano wodą zdejonizowaną do uzyskania pH obojętnego przy powierzchni membrany. Przed oznaczeniem cytotoksyczności membrany sterylizowano radiacyjnie wykorzystując kobaltowe źródło promieniowania $\gamma^{60}\text{Co}$, przy dawce promieniowania 25 kGy.

Struktura i własności fizykochemiczne hydrożelowych membran chitozanowych przedstawione zostały w publikacjach [24–27]. Membrany te charakteryzują się stosunkowo wysoką wytrzymałością (w zależności od stężenia polimeru wynosi ona od 1–3 N/mm²) [24]. Struktura jest rozwinięta na co wskazuje obraz powierzchni (membran po wysuszeniu liofilizacyjnym) pod mikroskopem scanningowym (RYS. 1) [25].

Many experiments on animals show that chitosan can enhance wound healing by increasing the supply of phagocytic cells (segmented granulocytes and macrophages) to the place of infection and by stimulating migration and proliferation of the cells of endothelium vessels and fibroblasts, and according to some researchers, also keratinocytes. It has been proved that chitosan has a static and even bactericidal and fungicidal effect on yeast. Chitosan hydrogels are formed by phase inversion method through chitosan salt neutralization in basic water solution or water-alcohol solution, in the system of polycation (chitosan salt) – polyanion (tri, hexa sodium phosphate, sodium alginate) and gels formed at body temperature (with the use of β -sodium glycerophosphate, polyvinyl alcohol or employing enzymatic activity of urease at the temperature 37–40°C). Additional substances can be introduced into the formed structures. The presence of –OH and NH_2 groups, due to which the substances are immobilized, causes stability of the system irrespectively of the conditions in which it occurs (e.g. pH, temperature), which in turn enables controlled desorption of the immobilized substances. Chitosan hydrogels are investigated in respect to their applicability as drug carriers, dressings, including hybrid dressings which contain selected pharmacological agents, e.g. pain-killers, antibiotics or adjuvants on wound healing, and scaffolds for cell cultures [8–22]. The use of hydrogels in biomedical engineering requires primarily the determination of their cytotoxic properties.

Investigations of cytotoxic activity of chitosan membranes produced by the phase inversion method are discussed in the paper.

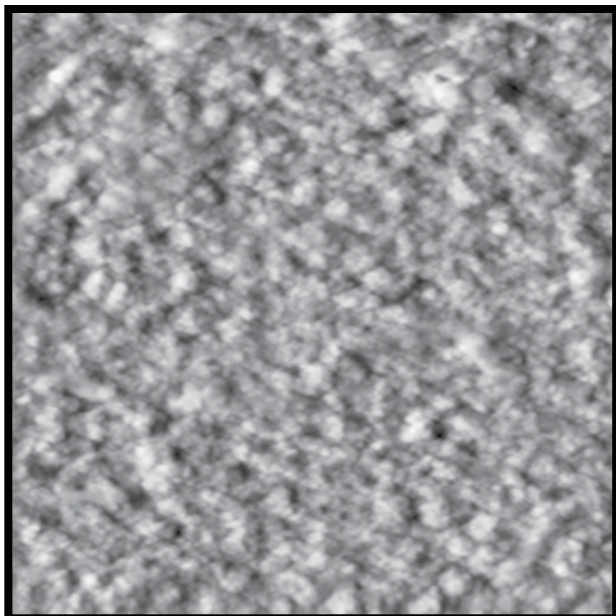
Experimental material

In cytotoxicity investigations chitosan hydrogel membranes formed by the phase inversion method from chitosan with the degree of deacetylation (DD) = 83% and 97% were used. The latter membranes were additionally plastified in 20% water solution of glycerol. In following part of paper the following marks are applied:

- chitosan hydrogels from chitosan with 83% DD - (b)
- chitosan hydrogels from chitosan with 97% DD - (c)
- chitosan hydrogels from chitosan with 97% DD plastified in glycerin - (d)

The membranes were made from chitosan acetate. Polymer concentration in the solution was 8%. The chitosan salt solution was distributed on a leveled flat surface by means of an applicator with slot height 0.8 mm. After that the plate was placed immediately in a neutralizing bath (10% water solution of NaOH). The time of neutralization was 24 h. Next, the samples were washed with deionized water to reach neutral pH at the membrane surface. Prior to cytotoxicity determination, the membranes were sterilized by radiation using a cobalt radiation source $\gamma^{60}\text{Co}$, at radiation dose 25 kGy.

Structure and physico-chemical hydrogel chitosan membranes were presented in publications [24–27]. These membranes are characterized by relatively high strength (depending on the polymer concentration range from approximately 1–3 N/mm²) [24]. The structure is developed as indicated by the image of the surface (membrane after drying, lyophilization) under the scanning microscope (FIG. 1) [25]. Structure organization depends on the concentration of polymer in solution and molecular weight of the polymer. Having the proper concentration of 8% and a specific molecular weight (500 kDa) the membrane with a high degree of order (crystallinity) can be obtained [26]. Water fills the spaces in the structure of pores and occurs as a partly related. Quantity of water bounded in the structure depends on the degree of crystallinity [27].



RYS. 1. Obraz membran pod mikroskopem sił atomowych [24].
FIG. 1. Membrane image under atomic force microscope [24].

Uporządkowanie struktury zależy od stężenia polimeru w roztworze membranotwórczym i masy cząsteczkowej polimeru. Przy odpowiednim stężeniu 8% i określonej masie cząsteczkowej (500 kDa) uzyskuje się membrany o wysokim stopniu uporządkowania (krystaliczności) [26]. Woda w strukturze wypełnia przestrzeń porów oraz występuje w postaci częściowo związanej. Związanie wody w strukturze zależy od stopnia uporządkowania [27].

Metoda badań

Badania wykonano w Pracowni Hodowli Komórkowych, Katedry i Zakładu Histologii i Embriologii AM we Wrocławiu. Badanie przeprowadzono zgodnie z PN-EN ISO 10993-5 „Biologiczna ocena wyrobów medycznych. Badania cytotoxycywności: metody *in vitro*” – marzec 2001. Badania przeprowadzono metodą bezpośredniego kontaktu.

Linia komórkowa

Badania przeprowadzono na referencyjnej linii komórkowej, fibroblastach mysich 3T3/Balb otrzymanych z Banku Tkanki, Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu.

Hodowlę komórek prowadzono w płynie hodowlanym Eagle'a z dodatkiem 10% inaktywowanej (30 min, 56°C) surowicy cielęcej oraz 100 j/ml penicyliny, 100 µg/ml streptomycyny i 2 mM/ml L-glutaminy w temp. 37°C, w atmosferze 5% CO₂. Komórki przeszczepiano stosując roztwór 0,25% trypsyny z 0,02% EDTA w PBS, o pH 7,2.

Badanie działania cytotoxycywnego metodą bezpośredniego kontaktu

Komórki fibroblastów mysich zostały założone na 12-dobkowych płytkach firmy NUNC w ilości 5x10⁶ każda. Po 24 godzinach komórki przykleiły się do podłoża i podzieliły, pokrywając około 60% powierzchni płytki. Po tym czasie pożywkę hodowlaną usunięto, a do każdego z naczyń dodano nowe medium. Na hodowlę komórkową nałożono próbki materiałów o wymiarach 10x10 mm i inkubowano w temp. 37°C, w atmosferze 5% CO₂. Każdy materiał oceniano w 3 powtórzeniach.

Experimental method

Experiments were made in the Cell Culture Laboratory of the Department of Histology and Embryology, Wrocław Medical University. Tests were carried out according to the standard PN-EN ISO 10993-5 “Biological evaluation of medical products. Cytotoxicity tests: *in vitro* methods” – March 2001. The tests were performed by the direct contact method.

Cell line

The experiments were carried out on a reference cell line, mouse fibroblasts Balb/C 3T3 supplied by the Tissue Bank of the Institute of Immunology and Experimental Therapy, Polish Academy of Sciences in Wrocław.

Cells were grown in culture in Eagle's medium supplemented with 10% inactivated (30 min, 56°C) fetal bovine serum and 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 2 mM L-glutamine at the temperature 37°C, in the atmosphere of 5% CO₂. The cells were inoculated using a 0.25% solution of trypsin with 0.02% EDTA in PBS, at pH 7.2.

Investigation of cytotoxicity by the direct contact method

Mouse fibroblast cells in the amount 5x10⁶ were placed on NUNC 12-well plates each. After 24 hours the cells adhered to the substrate and were divided covering about 60% of the plate surface. After that time the culture medium was removed and to each vessel a new medium was added. Next, the cell cultures were covered with 10x10 mm material samples and incubated at 37°C, in the atmosphere of 5% CO₂. Every material sample was evaluated in 3 replications.

Cytotoxicity evaluation

Quantitative and morphological changes after contacts with the tested materials were evaluated after 24, 48 and 72 h under a reverse phase-contrast microscope, at a magnification of 10x. Trypan blue staining was used to specify the number of dead cells. For a drop of cell suspension was added 1 drop of 0.4% trypan blue in PBS. After 1 minute drop of suspension was introduced to counting chambers Bürker and calculated the average of five squares each half of the chamber and the percentage of dead cells. Toxicity of the material samples was evaluated based on changes in cell morphology, survival and ability to proliferate.

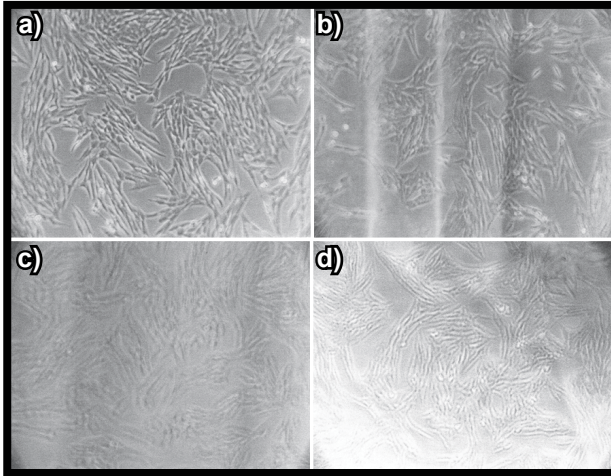
Statistical calculations

A statistical analysis was made using the t-Student test. It was assumed that correlation coefficients were significant at *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

Results and discussion

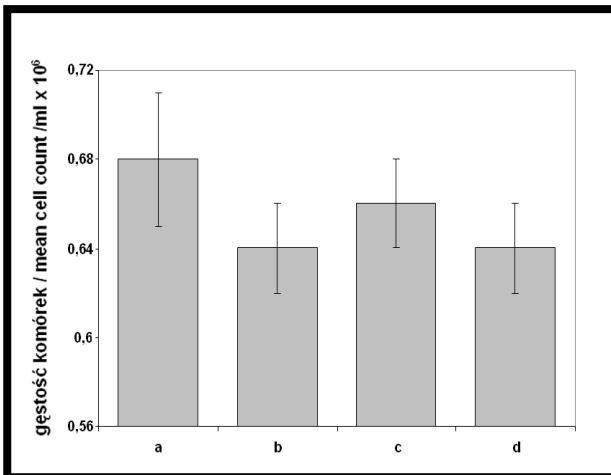
After 24 h, in the cultures which were in contact with all tested samples of hydrogel chitosan membranes no morphological changes in the cells were observed. Cell proliferation in the cultures with the samples was comparable and insignificantly lower as compared to control cultures. No dead cells were found in any culture (FIG. 2,3).

After 48 h, in the cultures which were in contact with all tested samples of chitosan hydrogel membranes no morphological changes of cells were observed. Cell proliferation in the cultures with membranes made from chitosan with 83% and 97% degrees of deacetylation without plastification in glycerol was slightly higher, and in the cultures with membranes plastified in glycerol slightly lower as compared to control cultures. No dead cells were found in any culture (FIG. 4,5).



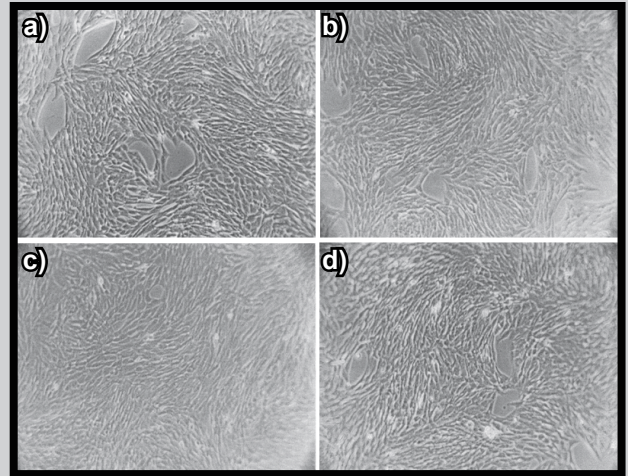
RYS. 2. 24 h hodowla fibroblastów mysich 3T3Balb/C: a - kontrola; b - po kontakcie z membraną z chitozanu o stopniu deacetylacji 83%; c - po kontakcie z membraną z chitozanu o stopniu deacetylacji 97%; d - po kontakcie z membraną z chitozanu o stopniu deacetylacji 97% plastyfikowaną w glicerolu. Fotografie b, c, d wykonane poprzez próbki membran chitozanowych.

FIG. 2. 24 h culture of mouse fibroblasts Balb/C 3T3: a - control; b - after contact with the membrane made from chitosan with 83% DD; c - after contact with the membrane made from chitosan with 97% DD; d - after contact with the membrane made from chitosan with 97% DD plastified in glycerol. Photographs b, c and d were taken through the sample.



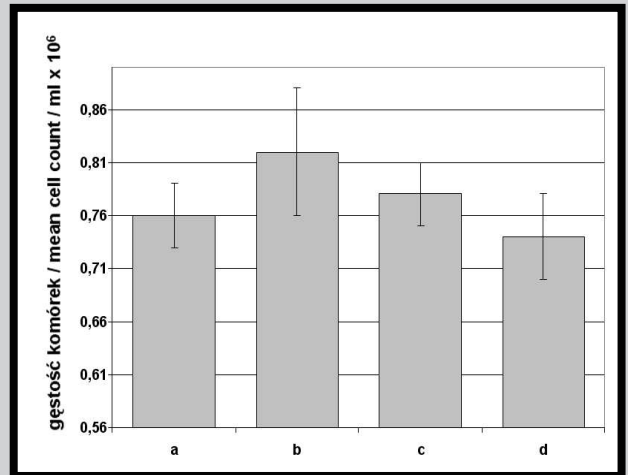
RYS. 3. Proliferacja fibroblastów mysich 3T3 Balb/C po 24 h w hodowlach z membranami chitozanowymi.

FIG. 3. Proliferation of mouse fibroblasts Balb/C 3T3 after 24 h in the cultures with chitosan membranes.



RYS. 4. 48 h hodowla fibroblastów mysich 3T3Balb/C: a - kontrola; b - po kontakcie z membraną z chitozanu o stopniu deacetylacji 83%; c - po kontakcie z membraną z chitozanu o stopniu deacetylacji 97%; d - po kontakcie z membraną z chitozanu o stopniu deacetylacji 97% plastyfikowaną w glicerolu.

FIG. 4. 48 h culture of mouse fibroblasts Balb/C 3T3: a - control; b - after contact with the membrane made from chitosan with 83% DD; c - after contact with the membrane made from chitosan with 97% DD; d - after contact with the membrane made from chitosan with 97% DD plastified in glycerol. Photographs b, c and d were taken through the sample.



RYS. 5. Proliferacja fibroblastów mysich 3T3 Balb po 48 h w hodowlach z membranami chitozanowymi.

FIG. 5. Proliferation of mouse fibroblasts Balb/C 3T3 after 48 h in the cultures with chitosan membranes.

Ocena działania cytotoksycznego

Zmiany ilościowe i morfologiczne, po kontakcie z badanymi materiałami oceniono po 24, 48 i 72 h w odwróconym mikroskopie kontrastowo-fazowym, w powiększeniu 10x. W celu określenia ilości martwych komórek zastosowano barwienie błękitem trypanu. Do 1 kropli zawiesiny komórek dodawano 1 kroplę 0,4% błękitu trypanu w PBS. Po 1 minucie wprowadzano kroplę zawiesiny do komory Bürkera i obliczano średnią z pięciu kwadratów każdej połowy komory oraz procent komórek martwych. Stopień toksyczności materiałów oceniono na podstawie zmian w morfologii komórek, ich przeżywalności i zdolności do proliferacji.

Obliczenia statystyczne

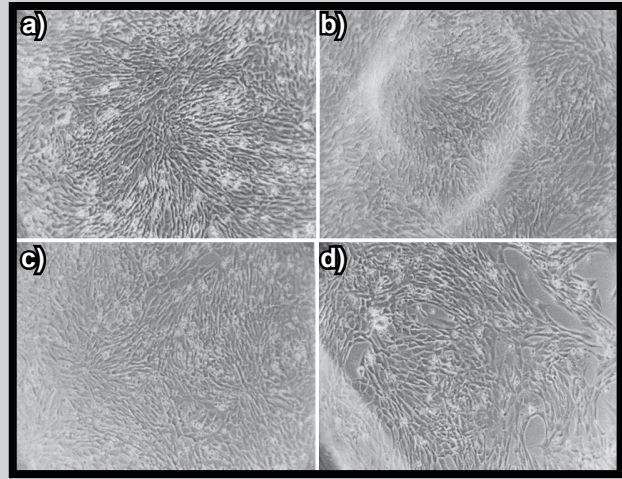
Analizę statystyczną wykonano z wykorzystaniem testu t-Studenta. Przyjęto, że współczynniki korelacji są istotne przy * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Wyniki badań

Po 24 h, w hodowlach po kontakcie z wszystkimi badanymi próbkami hydrożelowych membran chitozanowych nie stwierdzono zmian morfologicznych komórek. Proliferacja komórek w hodowlach z próbkami była porównywalna i nieistotnie niższa w porównaniu do hodowli kontrolnych. W żadnej hodowli nie stwierdzono komórek martwych (RYS. 2,3).

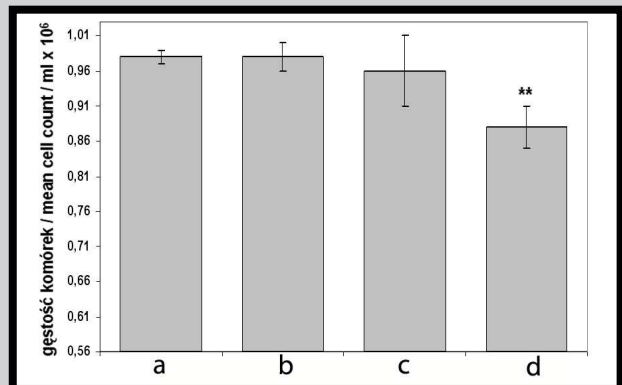
Po 48 h, w hodowlach po kontakcie z wszystkimi badanymi próbkami hydrożelowych membran chitozanowych nie stwierdzono zmian morfologicznych komórek. Proliferacja komórek w hodowlach z membranami z chitozanu o stopniu deacetylacji 83% i 97% bez plastyfikacji w glicerolu była nieistotnie wyższa, a w hodowlach z membranami plastyfikowanymi w glicerolu nieistotnie niższa w porównaniu do hodowli kontrolnych. W żadnej hodowli nie stwierdzono komórek martwych (RYS. 4,5).

Po 72 h, w hodowlach po kontakcie z wszystkimi badanymi próbkami hydrożelowych membran chitozanowych nie stwierdzono zmian morfologicznych komórek. Proliferacja komórek w hodowlach z membranami z chitozanu o stopniu deacetylacji 83% była identyczna, a w hodowlach z membranami z chitozanu o stopniu deacetylacji 97% nieistotnie niższa w porównaniu do hodowli kontrolnych. W hodowlach z membranami plastyfikowanymi w glicerolu stwierdzono istotnie niższą proliferację komórek ($p = 0,0054$) w porównaniu do hodowli kontrolnych. W hodowlach kontrolnych i w hodowlach z membranami chitozanowymi nieplastyfikowanymi stwierdzono 2% komórek martwych. W hodowlach z membranami plastyfikowanymi stwierdzono 5% komórek martwych (RYS. 6 i 7).



RYS. 6. 72 h hodowla fibroblastów mysich 3T3Balb/C: a - kontrola; b - po kontakcie z membraną z chitozanu o stopniu deacetylacji 83%; Fotografia wykonana poprzez próbkę; c - po kontakcie z membraną z chitozanu o stopniu deacetylacji 97%; d - po kontakcie z membraną z chitozanu o stopniu deacetylacji 97% plastyfikowaną w glicerolu. W lewym dolnym rogu widoczna próbka.

FIG. 6. 72 h culture of mouse fibroblasts Balb/C 3T3: a - control; b - after contact with the membrane made from chitosan with 83% DD; the photograph was taken through the sample; c - after contact with the membrane made from chitosan with 97% DD; d - after contact with the membrane made from chitosan with 97% DD plastified in glycerol. The sample is visible on the bottom left.



RYS. 7. Proliferacja fibroblastów mysich 3T3 Balb po 72 h w hodowlach z membranami chitozanowymi.

FIG. 7. Proliferation of mouse fibroblasts Balb/C 3T3 after 72 h in the cultures with chitosan membranes.

After 72 h, in the cultures which were in contact with all tested samples of chitosan hydrogel membranes no morphological changes in cells were found. Cell proliferation in the cultures with membranes made from chitosan with 83% DD was the same, and in the cultures with membranes made from chitosan with 97% DD it was insignificantly lower as compared to the control culture. In the cultures with membranes plastified in glycerol, cell proliferation was significantly lower ($p = 0.0054$) as compared to the control cultures. 2% dead cells were found in the control cultures and in the cultures with non-plastified chitosan membranes. In the cultures with plastified membranes 5% dead cells occurred (FIG. 6,7).

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że:

1. Membrany chitozanowe z chitozanu o stopniu deacetylacji 83 i 97% (nieplastyfikowane) po 24, 48 i 72 h kontaktu, nie wykazują działania toksycznego.
2. Membrany chitozanowe plastyfikowane w glicerolu, po 24 i 48 h kontaktu, nie wykazują działania toksycznego na fibroblasty mysie 3T3/ Balb, a po 72 h słabe działanie toksyczne.
3. Hydrożelowe membrany chitozanowe stanowić mogą potencjalny materiał na opatrunki.

Piśmiennictwo

- [1] Szymonowicz M., Pielka S., Marcinkowska A., Żywicka B., Gaman A., Haznar D., Pluta J.: Cellular response after stimulation of the gelatin-alginate matrixes. *Macromol. Symp.* 272 (2008) 58-62.
- [2] Winter G.D.: Formation of the scab and rate of epithelisation of superficial wounds in the skin of the young domestic pig. *Nature* 193 (1962) 293-294.
- [3] Benbow M., Burg G., Comacho Martinez F., Erikson E.: Guidelines for the outpatient treatment of chronic wounds and burns (1999) 12-21.
- [4] Sopota M., Łuczak J.: Profilaktyka i leczenie zachowawcze odleżyn (cz. I), *Zakażenia* 4 (2003) 81-88.
- [5] Szewczyk M.T., Jawień A.: Zachowawcze leczenie ran przewlekłych. *Zakażenia* 3(2004) 85-90.
- [6] Tyliczszak B., Pielichowski K.: Charakterystyka matryc hydrogełowych – zastosowania biomedyczne, *Czasopismo Techniczne, Wydawnictwo Politechniki Krakowskiej, Z. 1, 2007, ISSN 0011-4561.*
- [7] Jachowicz R.: *Farmacja Praktyczna, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 2010, ISBN: 978-83-200-4181-1.*
- [8] Okamoto Y., Tomita T., Minami S., Matsuhashi A., Kamazawa N.H., Tanioka S., Shigemasa S.: Effects of chitosan on experimental abscess with *Staphylococcus aureus* in dogs. *J. Vet. Med. Sci.* 57 (1995) 765-767.
- [9] Usami Y., Minami S., Okamoto Y., Matsuhashi A., Shigemasa Y.: Influence of chain length of N-acetyl-D-glucosamine and D-glucosamine residues on direct and component-mediated chemotactic activities for canine polymorphonuclear cells. *Carbohydrate Polymers* 32 (1997) 115-122.
- [10] Mori T., Okumura M., Matsuura M., Ueno K., Tokura S., Okamoto Y., Minami S., Fujinaga T.: Effects of chitin and its derivatives on the proliferation and cytokine production of fibroblasts in vitro. *Biomaterials*, 18 (1997) 947-951.
- [11] Kojima K., Okamoto Y., Miyatake K., Kitamura Y., Minami S.: Collagen typing of granulation tissue induced by chitin and chitosan, *Carbohydrate Polymers* 37 (1998) 109-113.
- [12] Ueno H., Yamada H., Tanaka I., Kaba N., Matsuura M., Okumura M., Kadosawa T.: Fujinaga T., Accelerating effects of chitosan for healing at early phase of experimental open wound in dogs. *Biomaterials* 20 (1999) 1407-1414.
- [13] Cho Y., Cho Y., Chung S., Yoo G., Ko S.: Water-soluble chitin as wound healing accelerator *Biomaterials*, 20 (1999) 2139-2145.
- [14] Mi F., Shyu S., Wu Y., Lee S., Shyong J., Huang R.: Fabrication and characterization of a sponge-like asymmetric chitosan membrane as wound dressing, *Biomaterials* 22 (2001) 165-173.
- [15] Ueno H., Nakamura F., Murakami M., Okumura M., Kadosawa T., Fujinaga T.: Evaluation effects of chitosan for the extracellular matrix production by fibroblast and the growth factors production by macrophages, *Biomaterials* 22 (2001) 2125-2130.

Conclusions

The experiments lead to the following conclusions:

1. The membranes made from chitosan with 83 and 97% DD (non-plastified) after 24, 48 and 72 h exposure do not reveal toxic activity.
2. Chitosan membranes plastified in glycerol, after 24 and 48 h exposure do not show toxic activity on mouse fibroblasts Balb/C 3T3, and after 72 h they reveal weak toxic effect.
3. Chitosan hydrogel membranes can be used as a potential dressing material.

References

- [16] Howling G.I., Dettmar P.W., Goddard P.A., Hampson F.C., Dornish M., Wood E.J.: The effect of chitin and chitosan on the proliferation of human skin fibroblasts and keratinocytes in vitro. *Biomaterials* 22 (2001) 2959-2966.
- [17] Ishihara M., Nakanishi K., Ono K., Sato M., Kikuchi M., Saito Y., Yura H., Matsui T., Hattori H., Ueono Yama M., Kurita A., Photocross-linkable chitosan as dressing for wound occlusion and accelerator in healing process. *Biomaterials* 23 (2002) 833-840.
- [18] Okamoto Y., Watanabe M., Miyatake K., Morimoto M., Shigemasa Y., Minami S.: Effects of chitin/chitosan and their oligomers/monomers on migrations of fibroblasts and vascular endothelium. *Biomaterials* 23 (2002) , 1975-1979.
- [19] Minagawa T., Okamura Y., Shigemasa Y., Minami S., Okamoto Y.: Effects of molecular weight and deacetylation degree of chitin/chitosan on wound healing. *Carbohydrate Polymers* 67 (2007) 640-644.
- [20] Keong L.C., Halim A.S.: *In vitro* in biocompatibility assessment for biomedical grade chitosan derivatives in wound management. *International Journal of Molecular. Sciences* 10 (2009) 1300-1313.
- [21] Spindola H., Fernandes J., De Sousa V., Tavaría F., Pintado M., Malcata X., Carvalho J.E.: Anti-inflammatory effect of chitosan oligomers. *New Biotechnology* 25 (2009) S9.
- [22] Jayakumar R., Prabaharan M., Sudheesh Kumar P.T., Nair S.V., Furuie T., Tamura H.: *Novel Chitin and Chitosan Materials in Wound Dressing*, Edited by Anthony N. Laskovski, ISBN: 978-953-307-513-6, Publisher: InTech, January 2011.
- [23] Kumirska J., Weinhold M.X., Czerwicka M., Kaczyński Z., Bychowska A., Brzozowski K., Thöming J., Stepnowski P.: *Influence of the Chemical Structure and Physicochemical Properties of Chitin- and Chitosan-Based Materials on Their Biomedical Activity Source: Biomedical Engineering, Trends in Materials Science*, Edited by Anthony N. Laskovski, ISBN: 978-953-307-513-6, Publisher: InTech, 2011.
- [24] Wylon E., Modrzejewska Z., Owczarż P., Zarzycki R.: Ocena właściwości fizykochemicznych błon chitozanowych. *Assessment of physicochemical properties of chitosan membranes*, *Engineering of Biomaterials* (2004) 129-131.
- [25] Stawczyk J., Modrzejewska Z., Sheng Li, Jankowska A.: Structural characteristics of atmospheric freeze-dried chitosan granules and membranes. *Chemical and Process Engineering* 28 (2007) 673-681.
- [26] Modrzejewska Z., Maniukiewicz W.: Determination of hydrogel chitosan membrane structure. *Advances in Chitin Science, V VIII, Poznań* (2005) 253-257.
- [27] Modrzejewska Z.: Characterization of water state in chitosan hydrogel membranes. *Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives*, 2011 in press.