

# OCENA WPŁYWU MATERIAŁÓW Z DIBUTYRYLOCHITYNY NA AKTYWACJĘ UKŁADU KRZEPNIĘCIA

MARIA SZYMONOWICZ\*, DANUTA PALUCH\*, LESZEK SOLSKI\*,  
STANISŁAW PIELKA\*, ANNA BŁASIŃSKA\*\*, IZABELLA KRUCIŃSKA\*\*,  
LIDIA SZOSLAND \*\*

\*ZAKŁAD CHIRURGII EKSPERYMENTALNEJ I BADANIA BIOMATERIAŁÓW  
AKADEMII MEDYCZNEJ WE WROCŁAWIU,

\*\*KATEDRA METROLOGII WŁÓKIENNICZEJ WYDZIAŁU INŻYNIERII  
I MARKETINGU TEKSTYLÓW POLITECHNIKI ŁÓDZKIEJ

*[Inżynieria Biomateriałów, 38-43, (2004), 123-126]*

## Wstęp

W latach osiemdziesiątych ubiegłego stulecia wiele ośrodków naukowych, zwłaszcza japońskich, rozpoczęło badania nad chityną i jej pochodnymi. Chityna posiada unikatowe właściwości, polegające na zdolności przyśpieszania gojenia się ran oparzeniowych, ropnych, odleżynowych lub ran pooperacyjnych. Chityna odznacza się dużym stopniem biogodności i jest biodegradowalna. Takie właściwości chityny od wielu lat zachęcają placówki naukowe do prac, zmierzających do wykorzystania jej w medycynie.

Chityna budową przypomina celulozę, w której grupa hydroksylowa w pozycji C-2 zastąpiona została przez grupę acetamidową. Chitynę, podobnie jak celulozę charakteryzuje niska rozpuszczalność i słaba chemiczna reaktywność. Niska rozpuszczalność stanowi barierę trudną do pokonania dla procesów przetwórstwa polimerów. Barierę tę można pokonać w wyniku modyfikacji chemicznej chityny. Głównym celem modyfikacji jest otrzymanie takiej pochodnej chityny, która byłaby łatwo rozpuszczalna w dostępnych rozpuszczalnikach i jednocześnie zachowałyby unikatowe właściwości chityny macierzystej.

Pochodną taką o nazwie dibutyrylochityna (DBC) opracowano w Katedrze Chemii Fizycznej Polimerów Politechniki Łódzkiej. Jest ona łatwo rozpuszczalna w popularnych rozpuszczalnikach, takich jak aceton, etanol lub N-metylopirolidon. Jest również błono- i włóknotwórcza. Łatwo daje się z niej wytworzyć włókna, włókniny, tkaniny i dzianiny. Równie łatwo można z materiałów tych po zastosowaniu łagodnej obróbki alkalicznej otrzymać materiały chitynowe (chityna regenerowana) bez uszkodzenia ich makrostruktury [1-3].

Na podstawie własnych badań biologicznych stwierdzono, że włókna z regenerowanej chityny i dibutyrylochityny nie wywołują działania cytotoksycznego, hemolitycznego, drażniącego i wywołują minimalną reakcję miejscową tkanek po implantacji [4-6]. Nie jest natomiast znany ich wpływ na układ krzepnięcia, układ immunologiczny i na regenerację tkanek, co może mieć znaczenie w zaopatrywaniu narządów mięsnych, np. wątroby.

Celem badań była ocena wpływu pochodnych chityny na układ krzepnięcia krwi w badaniach in vitro.

## Materiał i metody badań

Do badań użyto materiały z dibutyrylochityny (DBC), o

# EVALUATION OF THE INFLUENCE OF DIBUTYRYLCHITIN MATERIALS FOR ACTIVATION OF BLOOD COAGULATION SYSTEM

1 2 3

DANUTA PALUCH\*, MARIA SZYMONOWICZ\*, LESZEK SOLSKI\*,  
STANISŁAW PIELKA\*, ANNA BŁASIŃSKA\*\*, IZABELLA KRUCIŃSKA\*\*,  
LIDIA SZOSLAND \*\*

\*DEPARTMENT OF EXPERIMENTAL SURGERY AND BIOMATERIALS  
RESEARCH, MEDICAL UNIVERSITY OF WROCLAW.

\*\*TECHNICAL UNIVERSITY OF LODZ,  
DEPARTMENT OF TEXTILE METROLOGY

*[Engineering of Biomaterials, 38-43, (2004), 123-126]*

## Introduction

During the 1980's many scientific centers, mainly those in Japan, started the investigation of the chitin and its derivatives. Chitin is known to have some unique properties, of which the most important is the influence to accelerate the healing process of the infected, burned, decubitus or surgery wounds. Additionally chitin is showing the high level of biocompatibility and what more is bio-degradable. Such properties make it the very attractive for many scientific centers in which it is tested for possibly use in human and veterinary medicine.

The chemical structure of chitin is similar to those of cellulose, in which the hydroxyl group in position C-2 was replaced by the acetamide group. Chitin, like the cellulose, is characterized by lower solubility and very low chemical reactivity. Such a low solubility is very difficult to overcome during the possessing of polymers. Such barrier could be overcome by the chemical modification of the chitin. The main target of this modification is in receiving of such a derivative of the chitin, which should be easy soluble in most of available solvents but at the same time they should retain the specific properties of the pure chitin.

Such derivative named dibutyrylchitin (DBC) was worked out at Department of Physical Chemistry of Polymers in Lodz. It is easy soluble in most of the common solvents, such as acetone, ethanol or N-metylopirolidon. It also has the properties of being film and fiber makers. It could be easy transform into fibers, knitting, woven and non-woven materials. What more by the mild chemical process it could be easy received other materials such as regenerated chitin, without destroying of the main chitin macro-structure. [1-3]. On the basis of our own biological assessments it was shown that the fibers from regenerated chitin and dibutyrylchitin do not have cytotoxicity, irritation and hemolytic effects, and produce the minimal local reaction of the tissues after implantation. [4-6]. But we do not know too much about their influences on the blood coagulation system, immunological system and tissues regeneration, what could be very important in the treatment of the injuries of such organs as liver. The main scope of this study was the in vitro evaluation of the influence of the chitin derivatives on the blood coagulation system.

stopniu estryfikacji bliskim 2, przygotowane z chityny krylowej, dostarczonej przez Morski Instytut Rybacki w Gdyni. Lepkość istotna roztworu dibutyrylochityny w DMAc (dime-tyloacetamidzie), mierzona w temperaturze 25°C wynosiła 1,5 dL/g [1-2]. Próby różniły się między sobą sposobem formowania oraz postacią: włókna E1- formowane na mokro z roztworu DBC w etanolu; włókna B1- formowane na mokro z roztworu DBC w N-metylopirolidynie, błonki wylewane z roztworu DBC w etanolu, mikrosfery z DBC otrzymane metodą "suszenia emulsji"[6], nanowłóknina z DBC wytwarzana techniką electrospinningu [7].

Ocenie poddano próbki o jednakowej wadze. Doświadczenie wykonano na pełnej krwi cytrynianowej oraz na osoczu ubogopłytkowym. Krew ludzką grupy O Rh+ pobrano od dawców na cytrynian sodu w proporcji 1:10. Osocze otrzymano po odwirowaniu krwi (1500g x 10min) [8, 9].

#### Oznaczenie czasu krzepnięcia (rekalcytacji) pełnej krwi

Ludzką krew cytrynianową inkubowano z próbką materiału (0,5ml/0,0037g) w probówce PS przez 15, 30 i 60 min. w temp. 37°C. Następnie dodano 0,5 ml 0,25 mm/l roztworu chlorku wapniowego i mierzono czas krzepnięcia. Pomiar zakończono w momencie pojawienia się pierwszych nitek fibryny. Równolegle wykonano pomiary dla krwi kontrolnej - bez kontaktu z materiałem.

#### Oznaczenie czasu krzepnięcia osocza ubogopłytkowego

Osocze cytrynianowe wraz z próbką materiału (0,8ml/0,0062g) delikatnie wytrząsano przez 120 min. w temp. pokojowej. Równolegle nastawiono próbę kontrolną - osocze bez kontaktu z materiałem. Oznaczono: czas częściowej tromboplastyny po aktywacji (aPTT), czas protrombinowy (PT), aktywność czynnika XII (F XII), stężenie fibrynogeny (Fb).

Badania wykonano na aparacie BCT (Behring Coagulation Timer), firmy Dada Behring. Wyniki poddano analizie statystycznej. Obliczono średnią arytmetyczną i odchylenie standardowe. Istotne różnice w średnich wartościach określono testem T studenta. Przyjęto, że współczynniki korelacji są istotne przy \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001.

## Wyniki badań

Wpływ materiałów z DBC na krzepnięcie krwi cytrynianowej, określono poprzez pomiar czasu rekalcytacji po 15, 30 i 60 minutach (RYS. 1). Czas krzepnięcia stwierdzony dla ocenianych materiałów z DBC, we wszystkich czasach badania, był istotnie skrócony ( $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$ ) w porównaniu do kontroli. Najniższe wartości czasu rekalcytacji stwierdzono dla próbek o rozbudowanej powierzchni: włókien E1, B1 oraz nanowłókniny.

Wpływ materiałów z DBC na zewnętrzny układ krzepnięcia określono testem aPTT, a wewnętrzny testem PT. Oznaczono również stężenie fibrynogeny oraz aktywność czynnika XII.

Wartość aPTT, PT, aktywność czynnika XII i stężenie fibrynogeny, otrzymana dla osocza po 120 minutach kontaktu z różnymi próbkami DBC była porównywalna z wartością dla osocza kontrolnego. Oceniane materiały z DBC nie wywoływały zmian w osoczym układzie krzepnięcia, a otrzymane wartości pomiarowe dla każdego materiału są porównywalne między sobą oraz z grupą kontrolną (RYS. 2-4).

## Wnioski

1. Oceniane materiały z DBC wykazują aktywność prokoagulacyjną krwi.
2. Oceniane materiały z DBC nie wpływają na zmianę ak-

## Materials and methods

For the study we used the materials made of dibutyrylchitin (DBC) of the esterification level 2, prepared from the krill chitin supplied by Sea Fisheries Institute in Gdynia. The intrinsic viscosity of the dibutyrylchitin solution in DMAc (dimethyl-acetamide), measured at +25°C was at the level of 1,5 dL/g [1, 2]. The particular samples was different in regard to their moulding and form: fibers E1- were wet shaped from DBC ethanol solution; fibres B1- were wet shaped from DBC solution in N-methylpyrrolidone. The membranes were outpoured from DBC ethanol solution, microspheres from DBC by the method of "emulsion drying"[6], while nonwoven nano-fibres of DBC were received by technique of electrospinning [7].

All evaluated samples were of the same weight. Tests were carried on the full human citrated blood and on the low-platelet plasma. Human blood of the group O and Rh+ was collected from the donors on sodium citrate in proportion 1:10. The plasma has been received by centrifugation of the blood (1500g x 10min) [8, 9].

#### Coagulation time (recalcination) in full blood

Human citrated blood with the tested sample (0,5 ml/0,0037 g) was incubated in PS tubes for 15, 30 and 60 minutes at +37°C. Afterwards the amount of 0,5 ml (0,25 mm/l) of calcium chloride solution was added and coagulation time was measured. The measurement was cut off at the point when the first fibers of fibrin was observed. At the same time the measurements for the control blood - without contact with any materials - were done.

#### Coagulation time in plasma

Citrate plasma together with the tested sample of materials (0,8ml/0,0062g) was gently shaken during 120 minutes at the room temperature. At the same time the control sample was set up, i.e. the plasma without contact with any material. The following parameters were determined: activated partial thromboplastin time (aPTT), protrombin time (PT), factor XII activity (F XII), fibrinogen concentration (Fb). All aforementioned test were carried out on BCT (Behring Coagulation Timer) apparatus made by Dada Behring Co. Results were subject of statistical analysis. The averages and standard deviations were calculated. The real differences in the mean values were calculated with student test T. It was accepted that correlation indexes are of importance at \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001.

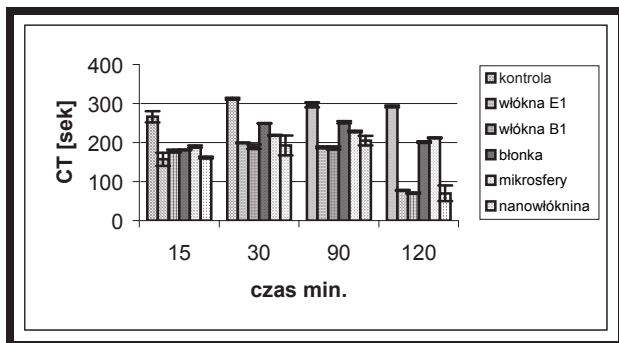
## Results

The influence of DBC materials on coagulation of citrated blood was evaluated by the measurement of recalcination time after 15, 30, 60 minutes (Fig. 1). Coagulation time noted for these tested materials of DBC, at all investigated times, were significantly shorter ( $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$ ) as compared to control group. The lowest values for recalcination time were noted for the samples of enlarged surface: fibers E1 and B1 and for the nonwoven nano-material..

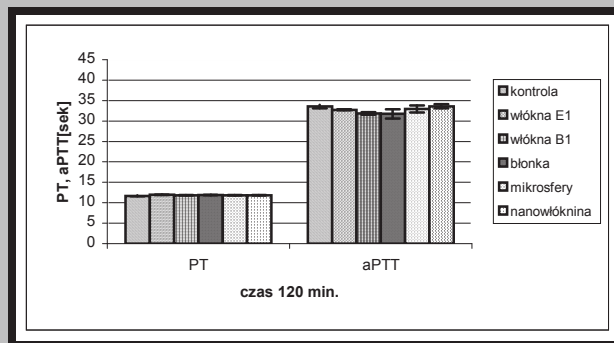
The influence of DBC materials on exogenic plasma coagulation system was evaluated by aPTT test, while endogenous - by PT test. At the same time the concentration of fibrinogen and factor XII activity were evaluated.

The values of aPTT, PT, factor XII activity and fibrinogen concentration received for the plasma after 120 minutes of contacts with different samples of DBC were all comparable with the values received for control plasma.

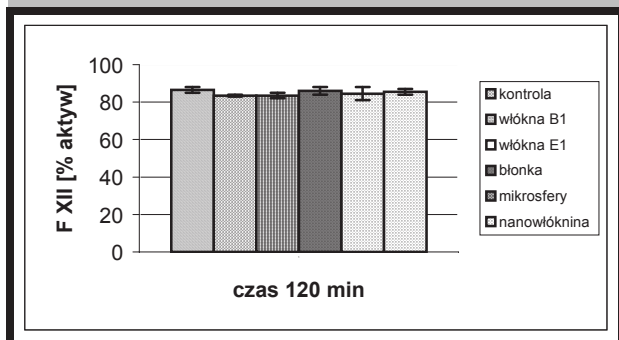
DBC materials, which have been evaluated, did not cause any changes in plasma coagulation system, and the values received for each material are comparable to each other



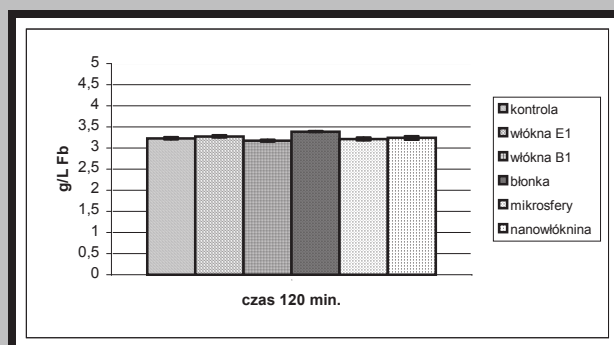
RYS. 1. Czas rekalcynacji krwi.  
FIG. 1. The blood recalcination time.



RYS. 2. Czas protrombinowy (PT) i czas częściowej tromboplastyny (aPTT) po aktywacji w osoczu.  
FIG. 2. Prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (aPTT) in plasma.



RYS. 3. Aktywność czynnika XII (F XII) w osoczu.  
FIG. 3. Factor XII activity (F XII) in plasma.



RYS. 4. Stężenie fibrynowu (Fb) w osoczu.  
FIG. 4. Fibrinogen (Fb) concentration in plasma.

tywności białek osoczowego układu krzepnięcia.

3. Włókna z DBC E1, B1 i nanowłóknina mogą znaleźć zastosowanie jako materiały hemostatyczne.

## Podziękowania

Badania wykonane zostały w ramach projektu badawczego nr 1063, w ramach prac własnych Uczelni.

Materiały do badań wykonano w ramach projektu badawczego Nr 4 T08E 001 24, wykonywanego w Katedrze Metrologii Włókienniczej Politechniki Łódzkiej i finansowanego przez Komitet Badań Naukowych.

## Results

The influence of DBC materials on coagulation of citrated blood was evaluated by the measurement of recalcination time after 15, 30, 60 minutes (FIG. 1). Coagulation time noted for these tested materials of DBC, at all investigated times, were significantly shorter ( $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$ ) as compared to control group. The lowest values for recalcination time were noted for the samples of enlarged surface: fibers E1 and B1 and for the nonwoven nano-material..

The influence of DBC materials on exogenic plasma coagulation system was evaluated by aPTT test, while endogenous - by PT test. At the same time the concentration of fibrinogene and factor XII activity were evaluated.

The values of aPTT, PT, factor XII activity and fibrinogene concentration received for the plasma after 120 minutes of contacts with different samples of DBC were all comparable with the values received for control plasma.

DBC materials, which have been evaluated, did not cause any changes in plasma coagulation system, and the values received for each material are comparable to each other and to those of control group. (FIG. 2-4).

## Conclusions

1. Evaluated materials of DBC showed activity procoagulation blood.
2. Evaluated materials of DBC do not have any influence on the activity of plasma protein coagulation system..
3. DBC fibers of both types i.e. E1, B1 as well as the nonwoven nano-material could find their proper application as haemostatic dressing materials.

## Piśmiennictwo

- [1] Szosland L., Janowska G.: The method of preparation of dibutylchitin, 1996, PL 169077 B1
- [2] Szosland L.: Synthesis of highly substituted butyrylchitin in the presence of perchloric acid, *J. Bioactive and Compat. Pol.*, 11, (1996), pp. 61-71
- [3] A. Błasiska, L. Szosland, I. Krucińska: "Metronidazole loaded microspheres and membranes of dibutylchitin: preparation and drug release determination", *Proceedings of "Healthcare and medical textiles'03" - The Third International Conference and Exhibition in Bolton on 8th and 9th July 2003.*
- [4] Paluch D., Szosland L., Staniszevska-Kuś J., Solski L., Szymonowicz M., Gębarowska E.: The biological assessment of chitin fibres. *Polim. w Med.* 2000, XXX, V, 3-32.
- [5] Szosland L., Krucińska I., Cisło R., Paluch D., Staniszevska-Kuś J., Solski L., Szymonowicz M.: Synthesis of dibutylchitin and preparation of new textiles made from dibutylchitin and chitin for medical applications. *Fibres & Textiles in Eastern Europe* 2001, v.9, (34), 54-57.

## Acknowledgements

The study was carried out as Medical University of Wrocław research project no 1063.

All materials for the study were worked out in Chair of Department of Textile Metrology at Lodz Technical University as the part of research project no.4 T08E 001 2 granted by State Committee for Scientific Research.

## References

- [6] Paluch D., Staniszevska-Kuś J., Solski L., Szymonowicz M.: New textiles made from dibutylchitin and chitin for medical applications. *Proceedings of the 1 st. Autex Conference, Volume 1, Tecnitex 2001, Povo de Varzim, Portugal, June 2001 r.*
- [7] Błasiska A., Krucińska I., Chrzanowski M., Domaradzka-Nicińska S.: Wytwarzanie nanowłóknistych biomateriałów z dibutylchitiny przy zastosowaniu elektroprzędzenia. *Materiały Konferencyjne X Seminarium pt. "Nowe aspekty w chemii i zastosowaniu chitiny i jej pochodnych"*, Gdynia, 25-27.09.2003 r., 17.
- [8] Szymonowicz M., Kratochwil J., Staniszevska-Kuś J., Paluch D., Solski L., Żywicka B.: Badania wpływu materiałów hemostaticznych na parametry układu krzepnięcia i fibrynolizę. *Inżynieria Biomateriałów* 1999, 7, 8, 2, 45-52.
- [9] Paluch D., Szymonowicz M., Pielka S., Rutowski R.: Badania in vitro wpływu materiałów poliestrowych o różnym stopniu zwilżalności powierzchni na parametry hematologiczne krwi oraz na parametry układu krzepnięcia i fibrynolizy. *Polim. w Med.* 2002,32, 1-2, 41-64.

## PRZEŻYWALNOŚĆ KOMÓREK ENKAPSULOWANYCH W HYDROŻELACH ALGINIANOWYCH

PIOTR WOŹNIAK\*, KATARZYNA FILIPCZAK\*\*, ALICJA K. OLEJ-  
NIK\*\*, MAŁGORZATA LEWANDOWSKA-SZUMIEŁ\*

\*ZAKŁAD BIOFIZYKI I FIZJOLOGII CZŁOWIEKA,  
AKADEMIA MEDYCZNA W WARSZAWIE

\*\*INSTYTUT TECHNIKI RADIACYJNEJ, WYDZIAŁ CHEMICZNY,  
POLITECHNIKA ŁÓDZKA

*[Inżynieria Biomateriałów, 38-43, (2004), 126-129]*

### Wstęp

Rusztowania hydrożelowe są obecnie szeroko badane jako potencjalne nośniki do transplantacji komórek i regeneracji uszkodzonych tkanek m. in. chrzęstnej, kostnej, mięśniowej i nerwowej [1].

Szczególnie wiele prac dotyczy wykorzystania hydrożeli w rekonstrukcji chrząstki [1-3]. Jednymi z najczęściej stosowanych materiałów do konstrukcji hydrożelowych nośników dla chondrocytów są żele alginianowe [4-6].

W ocenie wpływu podłoża na hodowane komórki jedną z podstawowych informacji jakie chcemy uzyskać jest żywotność/przeżywalność komórek w kontakcie z testowanym materiałem. Do najczęściej wykorzystywanych testów ilościowych służących do określenia żywotności komórek na-

## VIABILITY OF CELLS ENCAPSULATED IN ALGINATE HYDROGEL

PIOTR WOŹNIAK\*, KATARZYNA FILIPCZAK\*\*, ALICJA K. OLEJ-  
NIK\*\*, MAŁGORZATA LEWANDOWSKA-SZUMIEŁ\*

\*MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW,  
DEPARTMENT OF BIOPHYSICS AND HUMAN PHYSIOLOGY

\*\*TECHNICAL UNIVERSITY OF ŁÓDŹ,  
INSTITUTE OF APPLIED RADIATION CHEMISTRY (IARC-TUL)

*[Engineering of Biomaterials, 38-43, (2004), 126-129]*

### Introduction

Hydrogel scaffolds are being investigated as a potential carriers for cell transplantation and reconstruction of wide range of tissues, including cartilage, bone, muscle and neurons [1]. Among them, hydrogel materials are being used for cartilage tissue engineering [1-3]. Particularly alginate has been used to construct 3-D scaffolds for chondrocytes delivery [4-6].

Cell viability is one of the most important and desirable information for evaluation of the influence of the material on cells. For this purpose, colorimetric assays (MTT, XTT and Neutral Red stain (NR)) and hemocytometer cell count (Trypan Blue stain -TB) are the most popular quantitative tests [7, 8].

In the present study, human chondrocytes encapsulated in alginate hydrogel were investigated by means of MTT, NR and TB tests.