

# MATERIAŁY OPATRUNKOWE Z POCHODNYCH CHITYNY. BADANIA BIOLOGICZNE

STANISŁAW PIELKA\*, DANUTA PALUCH\*, JOLANTA STANISZEWSKA-KUŚ\*, BOGUSŁAWA ŻYWICKA\*, LESZEK SOLSKI\*,  
LIDIA SZOSLAND\*\*, ANNA CZARNY\*\*\*, EWA ZACZYŃSKA\*\*\*

\*ZAKŁAD CHIRURGII EKSPERYMENTALNEJ

I BADANIA BIOMATERIAŁÓW

AKADEMII MEDYCZNEJ WE WROCŁAWIU

\*\*KATEDRA CHEMII FIZYCZNEJ POLIMERÓW

POLITECHNIKI ŁÓDZKIEJ W ŁÓDZU

\*\*\*INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ

PAN WE WROCŁAWIU

Od materiałów opatrunkowych wymaga się nie tylko biernej ochrony rany przed wtórnym zakażeniem i urazem mechanicznym, ale również aktywnego działania w procesie gojenia. Chityna i jej pochodne posiadają unikatowe właściwości przyspieszające gojenie ran. Zapewniają wilgotne środowisko, optymalne w gojeniu rany, mają własności bakteriobójcze, przeciwbólowe, a także charakteryzują się dobrymi własnościami sorpcyjnymi. W organizmach żywych pod wpływem enzymów ulegają biodegradacji, której końcowym produktem jest glukoza [1,2,3,4,5,6,7].

W Katedrze Chemii Fizycznej Polimerów Politechniki Łódzkiej przygotowano dwa rodzaje materiałów opatrunkowych: włókninę polipropylenową pokrytą dibutyrylochityną i włókninę polipropylenową pokrytą regenerowaną chityną.

3% roztwór dibutyrylochityny (DBCH) w etanolu (3g/100 mL), o lepkości istotnej  $[\eta] = 1.57 \text{ dL/g}$ , наносono obustronnie na włókninę polipropylenową, a następnie suszono i ponownie powlekano roztworem DBCH, zawierającym dodatkowo bezwodną glicerynę o czystości czda. Udział wagowy DBCH w powleczonej włókninie wyniósł 40% (8,9).

Włókninę powleczoną DBCH poddano obróbce alkalicznej, w celu przemiany błonki DBCH na włókninie polipropylenowej w błonkę chityny (proces regeneracji chityny). Obróbkę alkaliczną przeprowadzono w 5% wodnym roztworze NaOH w ciągu 15 min. w temp. 90°C. Udział wagowy powłoki chitynowej wyniósł 30% [9,10].

Celem pracy była biologiczna ocena dibutyrylochityny i regenerowanej chityny jako materiałów opatrunkowych.

Opatrunki polipropylenowe z naniesioną warstwą dibutyrylochityny i regenerowanej chityny poddano ocenie biologicznej zgodnie z wymaganiami dla tego typu materiałów medycznych. Badania obejmowały:

- badania działania cytotoksycznego,
- badania poziomu cytokin: TNF i IFN,
- badania syntezy tlenków azotu  $\text{NO}_2/\text{NO}_3$ ,
- badania śródskórnego działania drażniącego,
- badania wpływu na gojenie się ubytków skóry pełnej grubości.

Badanie działania cytotoksycznego przeprowadzono na fibroblastach mysich 3T3/Balb metodą bezpośredniego kontaktu. Zmiany makroskopowe w hodowlach komórkowych oceniono po 24, 48 i 72 h. Włóknina polipropylenowa powleczona dibutyrylochityną i regenerowaną chityną nie wykazywały działania cytotoksycznego.

W celu określenia działania zapalnego i immunomodulacyjnego dibutyrylochityny i regenerowanej chityny przeprowadzono badania indukcji cytokin i syntezy tlenków

# DRESSINGS MADE OF CHITIN DERIVATIVES. BIOLOGICAL EVALUATION

..25..

STANISŁAW PIELKA\*, DANUTA PALUCH\*, JOLANTA STANISZEWSKA-KUŚ\*, BOGUSŁAWA ŻYWICKA\*, LESZEK SOLSKI\*,  
LIDIA SZOSLAND\*\*, ANNA CZARNY\*\*\*, EWA ZACZYŃSKA\*\*\*

\*INSTITUTE OF EXPERIMENTAL SURGERY

AND BIOMATERIALS RESEARCH

MEDICAL UNIVERSITY OF WROCLAW

\*\*TECHNICAL UNIVERSITY OF ŁÓDŹ,

DEPARTMENT OF PHYSICAL OF POLYMERS

\*\*\*INSTITUTE OF IMMUNOLOGY AND EKSPERYMENTAL THERAPY

POLISH ACADEMY OF SCIENCES IN WROCLAW

It is generally expected that the dressing materials should have not only properties of passive wound protection against the secondary infection and physical trauma, but as well their active role in the healing process itself. Chitin and its derivatives demonstrate the unique properties of hastening the wound healing process. They assure the most favourable wet environment during wound healing, show the bacteriostatical and painkilling properties, and what more are characterized by good sorption properties. In the living organisms the chitin and its derivatives are decomposed by the enzymes, and the final product of this biodegradation is glucose.

The two kinds of dressings materials were prepared in the Department of Physical of Polymers Lodz Technical University: polypropylene nonwoven coated with dibutyrylchitin and polypropylene nonwoven coated with regenerated chitin. The polypropylene nonwoven material was coated of the two sides with the dibutyrylchitin (DBCH) solution of 3% in ethanol (3g/100 mL), of the working viscosity  $[\eta] = 1.57 \text{ dL/g}$ , and later was dried and for the next time coated with the DBCH solution, containing additionally the analytically pure dehydrated glycerin. The coated nonwoven material prepared in this way had the 40% in weight of DBCH.

Such nonwoven coated with DBCH went through alkaline treatment in order to change the DBCH film which covered the polypropylene material into the chitin film - the process which is called the chitin regeneration. The alkaline treatment was done in 5% water solution of NaOH during 15 minutes in the temperature of 90°C. In result the weighing ratio of chitin coating was 30%.

The main target of the biological investigation was the assessment of the dibutyrylchitin and regenerated chitin as the dressing materials.

The polypropylene dressings coated with the dibutyrylchitin and regenerated chitin undergone the biological evaluation in accordance with the all the requirements stated for this kind of medical devices. These evaluation included:

- the cytotoxicity test,
- assessment of the level of cytokines TNF and IFN;
- the assessment of the synthesis of nitric oxides:  $\text{NO}_2$  and  $\text{NO}_3$ ;
- intracutaneous reactivity test,
- assessment of the influence on healing of skin lesions.

The evaluation of cytotoxicity was carried out on the referenced cell series of the mouse fibroblasts 3T3/Balb with the method of the direct contact. The macroscopic changes on the cells' cultures were assessed after 24, 48 and 72 hours. Neither the polypropylene coated with dibutyrylchitin nor that coated with chitin showed no cytotoxicity.

In order to evaluate the inflammatory and immunomodulatory effects of dibutyrylchitin and regenerated chitin, the evaluations of cytokines induction and synthesis of

azotu NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub>. Badania poziomu cytokin przeprowadzono na leukocytach ludzkiej krwi obwodowej metodą biologiczną, a syntezę tlenków azotu metodą Griess'a. Obydwa materiały nie stymulowały leukocytów ludzkich do wzrostu aktywności TNF i IFN oraz wzrostu poziomu tlenków azotu, a otrzymane wyniki były porównywalne z wynikami grupy kontrolnej bez kontaktu z materiałami.

Badania śródskórnego działania drażniącego przeprowadzono na królikach, u których wykonano śródskórną iniekcję wyciągów z badanych materiałów i wyciągów kontrolnych. Ocena zmian skórnych przeprowadzono po 24, 48 i 72 h po iniekcji. W żadnym terminie badania nie stwierdzono zmian skórnych w postaci zaczerwienienia lub obrzęku w miejscu iniekcji. Wskaźnik Pierwotnego Podrażnienia dla opatrunków polipropylenowych powlekanych dibutyrylochityną i chityną wyniósł 0,00.

Ocenę wpływu opatrunków polipropylenowych powlekanych dibutyrylochityną i regenerowaną chityną na proces gojenia się ubytków skóry pełnej grubości w porównaniu z opatrunkami z gazy przeprowadzono u królików na podstawie badań pooperacyjnych, makroskopowych i mikroskopowych.

W badaniach makroskopowych gojenia się ubytków skóry pełnej grubości, zaopatrywanych zarówno opatrunkami pokrytymi dibutyrylochityną jak i chityną stwierdzono, że rany wcześniej pokrywały się żółtawą błoną, były bardziej obkurczone, wilgotne i elastyczne, w porównaniu do ran kontrolnych zaopatrywanych gazą.

W badaniach mikroskopowych stwierdzono, że rany pod opatrunkiem polipropylenowym pokrytym dibutyrylochityną goiły się najszybciej. 10 dnia w miejscu ubytku widoczna była tkanka ziarninowa, którą na znacznej powierzchni pokrywał nowo powstały nabłonek wielowarstwowy płaski. 14 dnia większość ran wypełniała młoda tkanka łączna z licznymi naczyniami i włóknami klejorodnymi, a powstała bliznę łącznotkankową w całości pokrywał naskórek. Podobnie przebiegał proces gojenia się ubytków pod opatrunkiem z chityny. Jednakże tkanka łączna wypełniająca bliznę miała nieco dłużej, przeciętnie o 3 dni, charakter tkanki ziarninowej. W preparatach mikroskopowych z ran, zaopatrywanych standardowo opatrunkiem z gazy (kontrola) stwierdzono dość długo utrzymujący się proces wysiękowy. Tworzenie się tkanki ziarninowej następowało około 14 dnia. Tkanka ta tylko w niewielkim stopniu pokryta była naskórkiem, który narastał od brzegów rany. Wytworzenie się blizny łącznotkankowej o charakterze włóknistym i pokrycie jej nabłonkiem wielowarstwowym płaskim obserwowano dopiero 21 dnia po operacji.

## Wnioski

Opatrunki polipropylenowe pokryte dibutyrylochityną i chityną:

- 1) nie wykazują działania cytotoksycznego,
- 2) nie powodują wzrostu aktywności TNF i INF oraz wzrostu poziomu tlenków azotu w leukocytach ludzkich,
- 3) nie wykazują pierwotnego działania drażniącego,
- 4) przyspieszają proces gojenia się ran; faza zapalna jest krótsza i mniej nasiloną, a proliferacja nabłonka szybsza niż w ranach kontrolnych.

## Podziękowania

Praca w części finansowana przez KBN w ramach projektu badawczego NR 7 T08E 02321

nitric oxides NO<sub>2</sub> and NO<sub>3</sub> were carried out. The assessment of the cytokine levels were done on the human white blood cells (leukocytes) with the biological method, while the synthesis of nitric oxides according to the Griess' method. Both of these tested materials did not stimulate the human leukocytes to increased activity of TNF and IFN nor the increased level of nitric oxides were observed. These results were comparable to those received for control group with no contact with tested materials.

The assessment of intracutaneous irritation was evaluated on albino rabbits on which the intracutaneous injections of the extracts from tested materials and control extracts were made. The assessment of the skin changes (colour and oedema) was made according to the point method and was evaluated at the site of injection right after the injection and after 24, 48 and 72h. In none of these observation periods any changes were noted. The index of primary irritation (WPP) for both tested materials was at the level of 0,00 and so it has no importance at all.

The assessment of the influence of polypropylene dressings coated with dibutyrylchitin and regenerated chitin on the healing process of full-skin lesions were done on rabbits and compared to similar skin lesions covered only by gauze. This assessment was done during the post-surgery observations as well as on the basis of macroscopic and microscopic examination.

In macroscopic observation it was noted for both tested materials that the wounds were healed earlier, at the earliest stage were covered by yellowish membrane, were elastic and more wet as compared to the control wounds covered only with gauze.

During the microscopic examination it was noted that the wounds covered with the polypropylene dressing coated with dibutyrylchitin have been healing earlier. After 10 days in the site of skin lesion the granulated tissue was present covered almost entirely by the new epithelium. After 14 days almost all wounds were filled with the young connective tissue with numerous small vessels and with glue fibers. The scar was fully covered by the new epidermis. The healing process of the wounds covered with the chitin dressing was very similar. The granulated phase prolonged a little bit longer. The samples examined from the wounds covered only by gauze showed the prolonged exudative phase with the granulated tissue observed since 14-th day. The epidermis was not present on the entire scar. The process of the healing was ended after 21-st day.

## Cocnclusions

Polypropylene dressings coated with dibutyrylchitin and chitin are characterized by following properties:

- 1) do not show any cytotoxicity;
- 2) do not cause the increase in the activity of TNF and INF, neither the increase of the level of nitric oxide in human white cells;
- 3) do not demonstrate the primary irritations effect;
- 4) hasten the wound healing process, with the shorten and less pronounced inflammatory phase, and earliest epithelium proliferation in the control wounds..

## Acknowledgements

The Polish State Committee for Scientific Research financially supported this works in part within the project NO 7 T08E 02321

- [1] Ishihara M., Nakanishi K., Ono K., Sato M., Kikuchi M., Saito Y., Yuara H., Matsui T., Hattori H., Uenoyama M., Kurita A.: Photocrosslinkable chitosan as a dressing for wound occlusion and accelerator in healing process. *Biomaterials* 23 (2000), 833-840.
- [2] Okamoto Y., Kawakami K., Miyatake K., Morimoto M., Shigemasa I., Minami S.: Analgesic effects of chitin and chitosan. *Carbohydrate Polymers* 49 (2002), 249-252.
- [3] Zhishen I., Dongfen S., Weiliang X.: Synthesis and antibacterial activities of quaternary ammonium salt of chitosan. *Carbohydrate Research* 333 (2001), 1-6.
- [4] Yusof NL, Lim LY, Khor E.: Preparation and characterization of chitin beads as a wound dressing precursor. *J Biomed Mater Res* 2001 Jan;54(1):59-68.
- [5] Özmeriç N., Özcan G., Haytaç M., Alaaddino E., Sargon F.: Cytotoxicity and immunogenicity of SACCHACHITIN and its mechanism of action on skin wound healing. *J Biomed Mater Research*. 56, 1, 2001, 93-100.

- [6] Staniszewska-Kuś J., Paluch D., Szosland L., Kołodziej J., Staniszewska-Kuś J., Szymonowicz M., Solski L.: 'A biological investigation of dibutyrylchitin fibres', *Eng. of Biomaterials*, II, 7-8 (1999), 52-60.
- [7] Paluch D., Szosland L., Staniszewska-Kuś J., Solski L., Szymonowicz M., Gębarowska E.: The biological assesment of chitin fibres. *Polymers in Medicine*, V, XXX, (2000), 3-32.
- [8] Szosland L., Janowska G.: Sposób otrzymywania dibutyrylochitiny. Patent PL 169077 (1966).
- [9] Szosland L., Krucińska I., Cisko R., Paluch D., Staniszewska-Kuś J., Solski L., Szymonowicz M.: Synthesis of dibutyrylchitin and preparation of new textiles made from dibutyrylchitin and chitin for medical applications. *Fibres & Textiles in Eastern Europe*, 9, 3, 2001, 54-57.
- [10] Paluch D., Pielka S., Szosland L., Staniszewska-Kuś J., Szymonowicz L., Solski L., Żywicka B.: Biological investigation of the regenerated chitin fibres. *Eng. Of Biomaterials*. 12, 2000, 17-22.

## NOWE MOŻLIWOŚCI SYNTEZY I ZASTOSOWANIA W MEDYCYNIE BIODEGRADOWALNYCH KOPOLIMERÓW GLIKOLIDU NIE ZAWIERAJĄCYCH CYNK

P. DOBRZYŃSKI, J. KASPERCZYK, M. BERO

CENTRUM CHEMII POLIMERÓW PAN, ZABRZE

Olbrymi postęp w badaniach medycznych i w klinicyście, jaki notujemy w okresie ostatnich dwudziestu lat wymusza wręcz coraz większe i co raz szersze zastosowania nowych materiałów, w tym również polimerów biodegradowalnych. Do najważniejszych i najczęściej stosowanych grup reprezentujących ten rodzaj materiałów należą z pewnością alifatyczne  $\alpha$ -poliestry, a w szczególności polilaktyny, poliglikolid i kopolimery glikolidu i laktyny.

Poliglikolid jest pierwszym syntetycznym biodegradowalnym materiałem który znalazł powszechne zastosowanie w medycynie. W 1962 roku, pod nazwą Dexon, American Cyanamide Co. rozpoczął jego produkcję z przeznaczeniem głównie na degradowalne nici chirurgiczne. W 1975 roku rozpoczęto produkcję Vicrylu będącego kopolimerem glikolidu i L-laktyny. Wyroby wykonane z Dexonu i Vicrylu zaczęły być używane dosyć powszechnie w końcu lat siedemdziesiątych, początkowo w stomatologii i chirurgii szczękowej [1,2], później również w ortopedii [3,4] Wprowadzono do użycia biodegradowalne nici chirurgiczne i drobne implanty stosowane w leczeniu złamań. Stwierdzona klinicznie doskonała biokompatybilność poliglikolidu i jego kopolimerów z laktyną przyczyniła się do poszerzenia zastosowań tego typu polimerów w coraz większej ilo-

## BIODEGRADABLE GLYCOLIDE COPOLYMERS WITHOUT TOXIC TIN COMPOUND. NEW POSSIBILITIES OF SYNTHESIS AND APPLICATION IN MEDICINE

PIOTR DOBRZYŃSKI, JANUSZ KASPERCZYK AND MACIEJ BERO

CENTRE OF POLYMER CHEMISTRY POLISH ACADEMY OF SCIENCES,  
ZABRZE

Great progress in medical and clinical investigations, which was observed during the last twenty years, demands bigger and broader application of new materials as well as the biodegradable polymers. Surely, the aliphatic  $\alpha$ -polyesters, especially polylactide, polyglycolide and lactide/glycolide copolymers belong to the most important biodegradable materials and the most often ones used in medicine.

Polyglycolide is the first synthetic biodegradable material which is commonly applied in medicine. In 1962, American Cyanamide Co. started their production for forming biodegradable surgery threads generally, as name Dexon?. The production of Vicryl?, which is a glycolide/lactide copolymer was started in 1975. The products made from Dexon? or Vicryl? were used commonly since the end of the 70's, firstly in dentistry and jawbone surgery [1, 2], later also in orthopedics [3, 4]. Biodegradable surgery threads and small implants used in bone fracture treatment was introduced to application. Polyglycolide and glycolide/lactide copolymers very good biocompatibility, affirmed clinically, contributed to broadening applications of this polymers in more surgical operations.

Controlled release of drugs is a second, not less important field of biodegradable polymers application. Suitable selection of polymer carrier composition, its crystallinity level, morphological structure and molecular weight can be controlled, and, to some extent, speed of drug release and a period of release process. Materials from which carriers filled