

WŁÓKNA Z REGENEROWANEJ CHITYNY. BADANIA BIOLOGICZNE

*DANUTA PALUCH, *STANISŁAW PIELKA, **LIDIA SZOSLAND,
*JOLANTA STANISZEWSKA-KUŚ,
*MARIA SZYMONOWICZ, *LESZEK SOLSKI, *BOGUSŁAWA ŻYWIĆKA

*ZAKŁAD CHIRURGII EKSPERYMENTALNEJ I BADANIA BIOMATERIAŁÓW KATEDRY CHIRURGII URAZOWEJ I CHIRURGII REKI AKADEMII MEDYCZNEJ WE WROCŁAWIU
** KATEDRA CHEMII FIZYCZNEJ POLIMERÓW POLITECHNIKI ŁÓDZKIEJ

Streszczenie

Celem pracy była ocena biogodności włókien z chityny. Badania obejmowały: badania biologiczne wyciągów wodnych, badania działania cytotoksycznego, badania działania hemolitycznego, badanie śródskórnego działania drażniącego oraz badania implantacyjne.

Na postawie przeprowadzonych badań nie stwierdzono działania hemolitycznego, cytotoksycznego i śródskórnego działania drażniącego. Proces wgajania przebiegał z krótkotrwałą fazą wysiękową o małym stopniu nasilenia, która około 14 dnia przechodziła w fazę proliferacyjną prowadzącą do wytworzenia torebki łącznotkankowej.

Słowa kluczowe: regenerowana chityna, cytotoxicność, działanie drażniące, miejscowa reakcja tkankowa.

Pochodne chityny charakteryzuje się szeregiem specyficznych właściwości, takich jak: bioaktywność, odporność na sterylizację radiacyjną, biodegradowalność, zdolność do tworzenia błon i włókien, zdolność do mieszania z innymi polimerami [2, 6-11]. Wymienione właściwości pozwalają sądzić, że polimery te mogą znaleźć zastosowania medyczne jako materiały opatrunkowe, nośniki leków, implanty do kontaktu z tkanką kostną i tkankami miękkimi oraz krwią, a także jako surowce do modyfikacji innych biomateriałów.

Celem badań była ocena biologiczna włókien z regenerowanej chityny oraz ich przydatność do zastosowań medycznych. Przeprowadzono następujące badania:

- oznaczenia laboratoryjne wyciągów wodnych,
- badania działania hemolitycznego wyciągów wodnych,
- badania działania cytotoksycznego,
- badania śródskórnego działania drażniącego,
- badania miejscowej reakcji po implantacji.

Materiał

Ocenie biologicznej poddano włókna chitynowe otrzymane z włókien z dibutyrylochityny.

Włókna DBCH poddano alkalicznej obróbce 5% wodnym roztworem NaOH w temperaturze około 90°C, podczas której zachodziła reakcja hydrolizy grup estrowych i regeneracja grup hydroksylowych w makrocząsteczkach polimeru. Otrzymano włókna chitynowe bez destrukcji ich makrostruktury z wartością lepkości istotnej chityny 8.52 dL/g. Widma

BIOLOGICAL INVESTIGATION OF THE REGENERATED CHITIN FIBRES

...17...

*DANUTA PALUCH, *STANISŁAW PIELKA, **LIDIA SZOSLAND,
*JOLANTA STANISZEWSKA-KUŚ,
*MARIA SZYMONOWICZ, *LESZEK SOLSKI, *BOGUSŁAWA ŻYWIĆKA

*DEPARTMENT OF EXPERIMENTAL SURGERY AND BIOMATERIALS RESEARCH
CHAIR OF TRAUMATOLOGY, MEDICAL UNIVERSITY, WROCŁAW
**DEPARTMENT OF PHYSICAL CHEMISTRY OF POLYMERS
TECHNICAL UNIVERSITY OF ŁÓDŹ

Abstract

The main purpose of this investigation was the biological evaluation of the regenerated chitin fibres and their usability in medicine. Our investigation included laboratory tests of the aqueous extracts, haemolytic effects of the aqueous extracts, the cytotoxicity tests, intracutaneous reactivity test and the local reaction after implantation.

In the conclusion we say that the fibres of regenerated chitin do not cause the haemolysis, cytotoxicity or intracutaneous irritation. The healing process of both types of fibres involved a short exudative phase, which after 14 days was followed by a proliferative phase. The latter ended with the development of a connective tissue capsule.

Key words: regenerated chitin, cytotoxicity, haemolytic effect, local tissue reaction.

Derivatives of chitin are characterised by such specific properties as: high bioactivity, good tolerance for radiative sterilisation, biocompatibility, good biodegradation and formability (fibres, foils) and miscibility with other polymers [15].

All these properties give good reasons to undertake the evaluation of dibutyrylchitin and other derivatives of chitin as biomaterials for such medical applications as dressing materials, drug carriers, implants in contact with bones, soft tissues or blood, or as modifiers of other biomaterials [2, 6-11].

The main target of this investigation was the biological evaluation of the regenerated chitin fibres and their usability in medicine. Our investigation included:

- laboratory tests of the aqueous extracts,
- haemolytic effects of the aqueous extracts,
- cytotoxicity tests,
- intracutaneous reactivity test,
- local reaction after implantation.

Material

The chitin fibres obtained from dibutyrylchitin underwent the biological evaluation.

A part of DBCH fibres was used for the preparation of chitin fibres. For this purpose the DBCH fibres were treated for 20 min with a 5% NaOH water solution at 90°C, which brought about hydrolysis of the ester groups and regeneration of hydroxyl groups in the in the DBCH macromolecules [20]. The product of hydrolysis was washed several times with distilled water to remove traces of the side product -

w podczerwieni, zarejestrowane na spektrometrze Perkin-Elmer 2000 FT-IR dla błonek z DBCH (1) i otrzymanej chityny regenerowanej są przedstawione na RYS. 1. Całkowity zanik w widmie 2 pasma absorpcji przy 1740 cm^{-1} , odpowiadającego drganiom w grupie karbonylowej C=O, obecnej w widmie DBCH, oraz pojawienie się absorpcji w obszarze 3500 cm^{-1} , odpowiadającej drganiom wodoru w grupach hydroksylowych, obecnych w chitynie, świadczy o całkowitej hydrolizie makrocząstek DBCH i transformacji ich w chitynę [7-11].

Przed przystąpieniem do badań włókna sterylizowano tlenkiem etylenu - w sterylizatorze gazowym.

Metody i wyniki badań

Wszystkie badania przeprowadzono zgodnie z zaleceniami PrPN-EN ISO 10993 "Badania biologiczne materiałów medycznych" [3, 4].

Oznaczenia laboratoryjne wyciągów wodnych

Wyciągi wodne przygotowano w proporcji 3 g próbki na 50ml wody do iniekcji. Materiał wraz ze środkiem ekstrakcyjnym inkubowano w temperaturze 37°C przez 72 h.

Przeprowadzono następujące pomiary: pH, przewodność elektryczną właściwą, suchą pozostałość po odparowaniu oraz oznaczono wskaźnik wchłaniania.

Wyniki pomiarów laboratoryjnych wyciągów wodnych przedstawiono w TABELI 1. Podano średnie wartości obliczone z trzech wyciągów dla każdej próby.

Material / Material	Objętość uzyskanego wyciągu / The volume of obtained extract [ml]	Barwa / colour przezierność / clearness zapach / smell	pH	Przewodność elektryczna właściwa / Electrical conductivity [$\mu\text{S cm}^{-1}$]	Sucha pozostałość / Dry residue [g/100 cm^3]	Wskaźnik wchłaniania / Absorption index [%]
Chityna / Chitin	12	bezbardwy / colourless klarowny / clear słaby / slight	6,7	16	0,0075	16
Kontrola / Control	100	bezbardwy / colourless klarowny / clear brak / lack	5,9	1,3	--	--

Wszystkie oznaczane parametry były w granicach normy i były porównywalne z wartościami dla tego typu biomateriałów.

TABELA 1. Wyniki badań laboratoryjnych wyciągów wodnych.

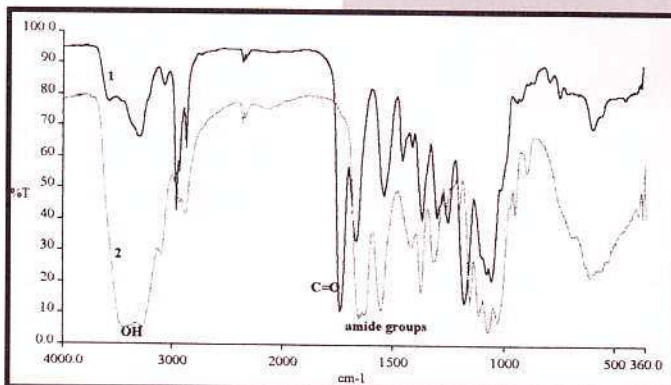
TABLE 1. The results of laboratory measurements of the aqueous extracts.

Badanie działania hemolitycznego wyciągów wodnych

Wyciągi wodne do badań działania hemolitycznego doprowadzono do izotoniczności stałym chlorkiem sodu.

Badania przeprowadzono z zastosowaniem erytrocytów ludzkich otrzymanych z krwi cytrynianowej grupy O Rh+. Wyciągi inkubowano z erytrocytami przez 24 godziny w ciepłarnie, w temperaturze 37°C. Po opadnięciu erytrocytów i po odwirowaniu (220 q/10 minut) mierzono fotometrycznie absorpcję płynu nad osadu na spektrofotometrze MARCEL s330 przy długości fali 540nm. Jako odnośnik użyto 150 mmol/l roztworu NaCl.

Średni procent hemolizy obliczono z 3 prób. Wyciągi z



RYS. 1. Widma IR dla błonek: DBCH (1), otrzymanej z chityny krylowej, oraz chityny regenerowanej (2), otrzymanej w wyniku zasadowej hydrolizy włókien z DBCH.

FIG. 1. IR spectra of DBCH (1) obtained from krill chitin and regenerated chitin (2) obtained after alkaline treatment applied to DBCH fibres.

sodium butyrate - and excess of NaOH. The obtained chitin fibres had undamaged macrostructure and intrinsic viscosity of 8.52 dL/g (solvent - DMAC/5%LiCl, 25°C). IR spectra of the polymer films formed from the DBCH fibres (spectrum 1) and the regenerated chitin fibres (spectrum 2) are shown in FIG. 1. Infra-red spectra were recorded using the Perkin-Elmer 2000 FT-IR instrument.

Lack of absorption at 1740 cm^{-1} in spectrum 2, which is characteristic of the esters of saturated fatty acids like that in spectrum 1 for DBCH (carbonyl, C=O groups), and strong absorption at 3500 cm^{-1} due to hydroxyl groups, indicates complete hydrolysis of the DBCH macromol-

ecules and their transformation into chitin [7-11].

Both types of fibres before the investigation were sterilised with gaseous ethylene oxide.

Methods and results

All the tests were carried out in accordance with the European standard PrPN-EN ISO 10993: "Biological evaluation of medical devices".

Laboratory tests of the aqueous extracts

The aqueous extracts from the tested fibres were prepared in the proportion of 3 g of fibres per 50 ml of water for injection. The samples were incubated at the temperature of 37°C for 72 hours. Our investigations included assessment of pH, electrical conductivity, dry residue and absorp-

tion index.

The results of the laboratory tests for the aqueous extracts are given in TABLE 1. They represent average values calculated from three extracts for each tested sample.

The mean values of electrical conductivity and dry residue were comparable with those obtained for biomaterials of the same type.

Assessment of haemolytic effects of the aqueous extracts

The aqueous extract was prepared in the same way as for general laboratory assessment and was made isotonic

włókien z chityny nie wykazywały działania hemolitycznego. Procent hemolizy wyniósł 0,86 i nie przekroczył wartości dopuszczalnej przez normę, czyli 1% [1].

Badanie działania cytotoksycznego

Badania przeprowadzono na referencyjnej linii komórkowej, fibroblastach mysich 3T3/Balb. Komórki były przechowywane w ciekłym azocie, w temperaturze -173°C z dodatkiem około 10% DMSO. Po rozmrożeniu komórki były dwukrotnie pasażowane przy użyciu roztworu o składzie: 0,05% trypsyny + 0,02% EDTA w PBS, o pH 7,2.

Badanie przeprowadzono metodą pośrednią po kontakcie z wyciągiem, na warstwie komórek w ilości $2,5 \times 10^5$.

Jako środka ekstrakcyjnego użyto pożywki hodowlanej z surowicą o identycznym składzie jak stosowana do hodowli macierzystej. W warunkach aseptycznych, każdy rodzaj włókien o masie 1,5 g pocięto na kawałki długości około 1 cm i zalano 25 ml pożywki hodowlanej. Próby lekko wstrząsano na mikrowstrząsarce i inkubowano przez 24h w temperaturze 37°C . Po tym czasie ekstrakty dodano do hodowli komórek i inkubowano w 37°C .

Ocenie poddano następujące hodowle:

- hodowla kontrolna - hodowla macierzysta z pożywką nie poddaną inkubacji,
 - próba ślepa - hodowla z pożywką inkubowaną w 37°C przez 24 h,
 - próba badana - hodowla z wyciągiem z włókien z chityny.
- Ocenę zmian cytotoksycznych przeprowadzono po 48 h i 72 h.

Średnie wyniki badań dla trzech wyciągów z każdej próby przedstawiono w TABELI 2.

We wszystkich terminach w badanych hodowlach komórki miały prawidłowe cechy morfologiczne. Nie stwierdzono aglutynacji, wakuolizacji i lizy błon komórkowych.

by an addition of a solid NaCl.

The erythrocytes were obtained from the citrated human blood, group 0 Rh+. The aqueous extracts with the erythrocytes were incubated for 24 hours at the temperature of 37°C . After the sedimentation of erythrocytes and their centrifugation (at 220g/10 minutes) the absorption of the liquid from above the sedimented erythrocytes was measured by a photometric method at the wavelength of 540nm, using the spectrophotometer MARCEL s330. It is accepted that the tested materials do not give haemolytic effects if the mean percentage of haemolysis does not exceed 1% [1].

The mean percentage of haemolysis was calculated from 3 samples. The extracts from the chitin fibres did not show any haemolytic effects. The percentage of haemolysis was 0,86% and thus it did not exceed the value of 1% given by the standard.

Cytotoxicity

The evaluation was carried out on the referenced cell series of the mouse fibroblasts 3T3/Balb. The cells were kept in liquid nitrogen at the temperature of -173°C with a 10% addition of DMSO. After unfreezing the cells were twice subjected to passage with a solution of 0,05% trypsin + 0,02% EDTA in PBS of the general pH value of 7,2.

The assessment was made by indirect method after the contact with the extract, on the cells growing in the shape of so called "monolayer".

The culture medium with added serum, of the same content as the maternal (native) culture was used as the extract agent. Under the aseptic conditions the fibres of the 4,5 weight were cut off for the pieces of ca. 1cm long and were put into three containers at ca. 1,5g in each. These

Hodowla/ Culture	Czas obserwacji/Observation time							
	Zmiany morfolo- giczne/ Morpho- logical changes	Oddzielenie od podłoża/ Separation from the culture base [%]	Komórki/Cells		Zmiany morfo- logiczne/ Morpho- logical changes	Oddzielenie od podłoża/ Separation from the culture base [%]	Komórki/ Cells	
			Żywe/ Live [$\times 10^5$]	Martwe/ Death [%]			Żywe/ Live [$\times 10^5$]	Martwe/ Death [%]
Hodowla kontrolna/ Control culture	0	1-2	3,80	5	0	3	9,0	5
Próba ślepa/ Blind culture	0	1-2	3,76	4	0	3	9,4	6
Hodowla +wyciąg z chityny/ Culture with the chitin extract	0	1-2	3,73	7	0	3	7,0	5

TABELA 2. Zmiany cytotoksyczne w hodowlach fibroblastów mysich.

TABLE 2. The assessment of the cytotoxicological changes in culture of mouse fibroblast.

Po 48 godzinach zarówno w próbach badanych jak i kontrolnych liczba komórek oddzielonych od podłoża była identyczna i wynosiła 1-2%. Liczba martwych komórek w próbie z wyciągiem z chityny była większa niż w próbie ślepej i kontrolnej i wynosiła 7%. Liczba komórek żywych w hodowlach z wyciągami z badanych prób wzrosła lecz była nieco mniejsza niż w próbie kontrolnej i ślepej.

Po 72h liczba komórek oddzielonych od podłoża w próbach badanych była identyczna jak w próbie kontrolnej i ślepej i wynosiła 3%. Liczba komórek martwych w hodowli z wyciągami z chityny zmalała do 5%. Po 72h nastąpił prawie dwukrotny wzrost liczby żywych komórek w hodowlach

probes were flooded by 25ml each of the breeding culture. As the blind probe the culture medium with added serum was used. All probes were lightly shaken at the microshaker and incubated for 24h at the temperature of 37°C . After that the extracts were added to the cell culture, which later were incubated in the temperature of 37°C .

The following culture were assessed:

- as the control culture: the maternal culture medium, which was not incubated;
- as the blind probe: the culture medium incubated at 37°C for 24h;
- the tested probe: the culture with added extract of the chitin fibres.

z wyciągami z badanych prób, lecz było ich mniej niż w próbie kontrolnej i ślepej.

Badanie śródskórnego działania drażniącego

Badania przeprowadzono poprzez ocenę działania drażniącego wyciągów przygotowanych z zastosowaniem soli fizjologicznej - wyciąg polarny oraz z zastosowaniem oleju sezamowego - wyciąg niepolarny.

Wyciągi przygotowano z zachowaniem następujących parametrów:

- ilość próbek - 1,5g,
- rozdrobnienie próbki - włókna długości około 1 cm,
- środek ekstrakcyjny - 25ml soli fizjologicznej lub oleju sezamowego,
- warunki ekstrakcji - 37°C przez 72h,

Próby ślepe stanowiły sól fizjologiczna i olej sezamowy inkubowane w tych samych warunkach co wyciągi z materiałem.

Ocenę śródskórnego działania drażniącego każdej próby przeprowadzono na 3 królikach albinosach, rasy nowozelandzkiej, obojga płci, o wadze od 2,8 kg do 3,2 kg. Badanie przeprowadzono wstrzykując śródskórną po 0,2ml wyciągów polarnych i niepolarnych z badanych materiałów oraz prób kontrolnych.

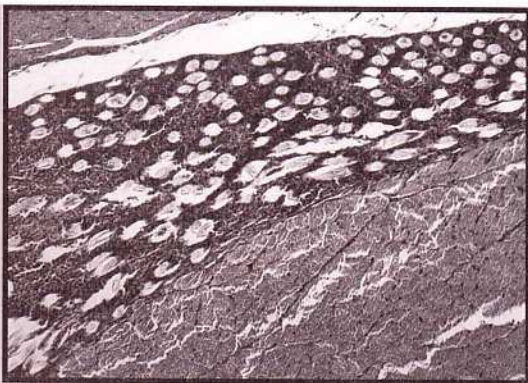
Zmiany skórne w miejscach wstrzyknięć oceniano bezpośrednio po iniekcji oraz po upływie 24, 48 i 72h.

Bezpośrednio po iniekcji wyciągów polarnych i niepolarnych z chityny u żadnego ze zwierząt nie stwierdzono zmian typu zaczerwienienia i obrzęku. Po iniekcji wyciągów polarnych z chityny nie obserwowano zmian skórnych po 24, 48 i 72h. Natomiast po iniekcji wyciągów niepolarnych z chityny stwierdzono u jednego zwierzęcia w jednym miejscu wstrzyknięcia lekkie zaczerwienienie skóry. Po 48 i 72h zmiany skórne ustąpiły.

Na podstawie uzyskanych wyników dla każdego materiału obliczono wskaźnik pierwotnego podrażnienia - WPP. Wskaźnik Pierwotnego Podrażnienia dla chityny wynosił: $1/30 = 0,033$ i był bez znaczenia.

Badanie miejscowej reakcji po implantacji

Badania przeprowadzono na 40 szczurach rasy Wistar, samcach, o masie ciała 180 g, w wieku około 2 miesięcy. Badane próby implantowano w mięśnie pośladkowe szczura [5].



RYS. 2. Obraz mikroskopowy 7 dni po implantacji włókien z chityny. Implant otoczony pasmem tkanki ziarninowej. W centrum ognisko granulocytów wielopłatowych obojętnochłonnych (Van Gieson, 140x).

FIG. 2. The microscopic view of chitin fibres 7 days after the implantation. The implanted fibres are surrounded by a layer of granulation tissue; in the middle - a focus of multilobar neutrophilic granulocytes (Van Gieson, 140x).

The assessment of the cytotoxicity was evaluated after 48 and 72h.

The means results for the three extracts of each probe are shown in the TABLE no. 2.

For all the assessment periods the cells culture under evaluation were all of proper morphological characters. There were no any visible agglutination, vacuolisation nor lysis of cells' walls.

After 48h in the tested probes as well as in control ones, the number of the cells separated from the culture's base were similar and figured 1-2%. The number of the dead cells in the probe containing the extracts from chitin was higher then in the blind probe and figured 7%. The number of the living cells in the cultures containing the extracts of the tested probes slightly increased but still was lower then the number of cells in the control and blind probes.

After 72h in the tested probes as well as in control ones, the number of the cells separated from the culture's base were similar and figured 3%. The number of the dead cells in the probe containing the extracts from chitin decreased up to 5%. After 72h the number of the living cells increased twice in the cultures containing the extracts of the tested probes, but still being lower then the number of cells in the control and blind probes.

The irritation test

For the purposes of this assessment the polar extract with saline and nonpolar extract with the sesame oil were prepared.

The prepared extracts are characterised as follows:

- the weight of the probe - 1,5 g
- the granulation of the probe - the fibres of ca. 1cm long
- the extract agent - 25 ml of saline or sesame oil
- the condition of extraction - in 37°C for 72h.

The blind probes were made of saline and sesame oil and were incubated under the same condition as for the probes with tested material.

The assessment of the intracutaneous irritation of each extracts sample was evaluated on three albino rabbits, of the New Zealand breed of both sexes, weighing between 2,8 and 3,2 kg.

The changes on the skin in the sites of injections were evaluated right after the injections were made and after 24, 48 and 72 hours.

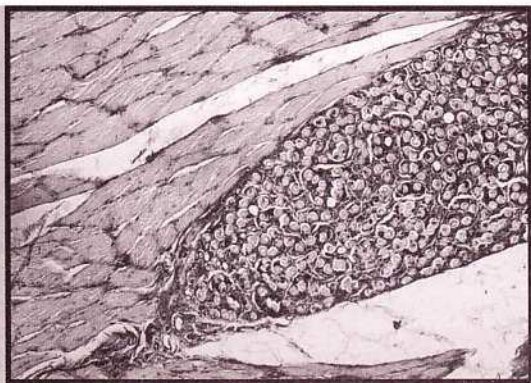
Directly after the injection of polar and nonpolar extracts of the chitin, as far as the erythema and oedema were concerned, there were no changes noted even on single animal. After the injection of polar extracts of the chitin there were no any changes observed after 24, 48 nor 72 hours. After the injection of nonpolar extracts of the chitin one animals showed at one injection site the light erythema of the skin. This reaction retreated after 48 hours.

The Index of Primary Irritation for the chitin figured $1/30 = 0,333$ and in general assessment was of no importance.

The assessment of the local reaction after implantation

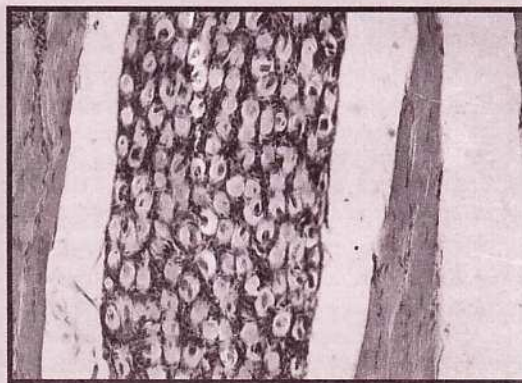
The surgery was carried out on 40 male, albino rats of Vistar breed, weighing ca. 180g and being 2 months old each. The tested fibres material was inserted parallel to the muscle fibres of the gluteal muscles using the typical surgical needle [5].

The histopathological slides were dyed by HE method. After 7 days since the implantation in the microscopic view there were seen cross sections of the implanted fibres surrounded by the fibrinous exudate reach in cell. The chitin fibres had oval shape with slightly opalescent edges. The cell-fibrin exudate visibly penetrated between the filaments of the chitin fibres, and had two distinct layers. At the edges of the implanted fibre, close to the surrounded muscles there



RYS. 3. Obraz mikroskopowy 90 dni po implantacji włókien z chityny. Pęczek włókien poprzestany tkanką łączną włóknistą. Wokół włókien widoczne komórki olbrzymie typu ciała obcego (H&E, 140x).

FIG. 3. The microscopic view 90 days after the implantation of the chitin fibres. A bundle of fibres is overgrown by a fibrous connective tissue. Around the fibres there are giant cells of the foreign-body type (H&E, 140x).



RYS. 4. Obraz mikroskopowy 150 dni po implantacji włókien z chityny. Włókna z chityny otoczone i przerośnięte tkanką włóknistą (Van Gieson, 140x).

FIG. 4. The microscopic view 150 days after the implantation of the chitin fibres. The chitin fibres are overgrown by a connective tissue (Van Gieson, 140x).

Badania makroskopowe i mikroskopowe przeprowadzono 7, 14, 30, 90, 150 i 180 dni po implantacji.

7 i 14 dnia po implantacji, w obrazie mikroskopowym preparatów histologicznych barwionych hematoksyliną i eozyną widoczne były przekroje poprzeczne włókien z chityny, otoczone wysiękiem komórkowo-włóknikowym. Włókna chityny miały kształt owalny o lekko opalizujących konturach. W wysięku włóknikowo-komórkowym, który wnikał pomiędzy włókna i ograniczony był do obszaru implantu, można było wyróżnić dwie warstwy. Na obwodzie implantu w pobliżu mięśni występowały przede wszystkim fibroblasty, fibrocyty i pojedyncze jednojądrzaste komórki typu limfocyta. W centrum implantu widoczne były natomiast dość liczne rozlane ogniska granulocytów wielopłatowych obojętnochłonnych (RYS. 2).

30 dni po implantacji włókna chityny były poprzestane bogatokomórkową tkanką łączną z przewagą fibroblastów i fibrocytów. Gdziekolwiek występowały pojedyncze komórki typu limfocyta oraz pojedyncze komórki olbrzymie typu ciała obcego. Cały pęczek włókien oddzielała od mięśni cienka - 1 szerokości włókna mięśnia poprzecznie prążkowanego - tkanka łączna z licznymi włóknami klejnorodnymi.

90 dni po implantacji w preparatach histologicznych barwionych metodami HE i van Gieson stwierdzono, że poszczególne włókna z chityny przerastała i otaczała tkanka łączna włóknista. W bezpośrednim sąsiedztwie włókien widoczne były liczne komórki olbrzymie typu ciała obcego (RYS. 3).

150 i 180 dni po implantacji obraz mikroskopowy był podobny. Włókna chityny o niezmięnionej ilości, gęsto ułożone, otaczała i przerastała tkanka łączna. Kolor włókien uległ zmianie z szaro-opalizującego na kolor różowo-fioletowy, co może sugerować początek resorpcji włókien z chityny (RYS. 4).

Omówienie wyników badań

Na podstawie przeprowadzonych badań laboratoryjnych wyciągów wodnych z chityny i dibutyrylochityny obejmujących pomiar pH, przewodności elektrycznej właściwej i suchej pozostałości po odparowaniu stwierdzono, że uzyska-

were find mainly fibroblasts, fibrocytes and single mononuclear cell of lymphocyte type. In the centre of the implanted fibre were numerous diffuse focuses of multilobulus neutrophils (FIG. 2).

The chitin fibres after 14 days since their implantation were surrounded by the layer of connective tissue, which separated the chitin itself from the transverse striated muscles.

The chitin fibres after 30 days since their implantation were overgrown by the reach-cell connective tissue with the fibroblasts and fibrocytes. Disspersly were find also cells of lymphocyte type and great cells of the foreign-body type. The fibres were separated from the muscles by the thin layer of the tissue (measured 1/4 of the muscle fibre) with numerous collagenous fibres.

In the histopathological samples which were dyed by HE and Van Gieson, after 90 days since the implantation was performed, it was observed that the single fibres of the chitin were overgrown and surrounded by the fibrous connective tissue. Very close to the fibres there were abundant great cells of the foreign body type (FIG. 3).

After 150 and 180 days since the implantation of the chitin fibres the microscopic view was similar to that one mentioned above. The chitin fibres in the same number were densely arranged and surrounded by the connective tissue. The changes in the colour of the fibres might suggest that the resorption process has just begun (FIG. 4).

Summary

On the basis of carried laboratory tests of the aqueous extracts, such as pH evaluation, electric conductivity and dry residue assessment we can stated that the obtained results are within the limits of the standards and are comparable to these given for similar kinds of medical devices, e.g. for Dexon sutures: pH - 6,10; electric conductivity - 31 μScm^{-1} ; dry residue after evaporation - 0,0014 g/100 cm^3 .

The mean percentage of hemolysis counted from the three samples made for chitin extracts was 0,86% and did not exceed the value of 1% which is accepted by the standards.

ne wyniki mieściły się w granicach normy i były porównywalne z wynikami otrzymanymi dla wyciągów wodnych dla nici chirurgicznych Dexon: pH - 6,10; przewodność elektryczna właściwa - 31 mScm^{-1} ; sucha pozostałość po odparowaniu - 0,0014 g/100 cm^3 .

Średni procent hemolizy obliczony z 3 prób dla wyciągów z chityny wynosił - 0,86%, a procent hemolizy dla nici Dexon-0,64 i nie przekroczył wartości dopuszczalnej przez normę.

W badaniach działania cytotoksycznego, przeprowadzonych na fibroblastach mysich, stwierdzono prawidłowe cechy morfologiczne. Nie obserwowano aglutynacji, wakuolizacji i lizy błon komórkowych. Ilość komórek oddzielonych od podłoża była identyczna jak w hodowlach kontrolnych. Nieco większa ilość komórek martwych i mniejszy przyrost komórek w hodowlach z wyciągami z chityny jest prawdopodobnie spowodowany pozostałością tlenu etylenu zastosowanego do sterylizacji włókien.

Badanie odczynowości śródskórnej wyciągów z chityny wykazało brak działania drażniącego, a wskaźnik pierwotnego podrażnienia był bez znaczenia.

W przeprowadzonych badaniach patomorfologicznych obejmujących wyniki badań makroskopowych i mikroskopowych po implantacji, stwierdzono dużego stopnia biogodność włókien z regenerowanej chityny. Proces wgajania przebiegał z krótkotrwałą fazą wysiękową o małym stopniu nasilenia, która około 14 dnia przechodziła w fazę proliferacyjną prowadzącą do wytworzenia torebki łącznotkankowej szerokości 1 średnicy implantu. W terminach późniejszych tj. 30 do 180 dni po implantacji wytworzona torebka była cienka, a jej szerokość nie przekraczała 0,5 - 1 szerokości włókna mięsnego poprzecznie prążkowanego. Odczyn tkankowy po implantacji włókien z chityny można uznać za minimalny.

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że włókna z regenerowanej chityny spełniają podstawowe wymagania biologiczne dla wyrobów medycznych zawarte w PrPN-EN ISO 10993 "Biologiczna ocena wyrobów medycznych"

In the assessment of the cytotoxicity which was carried out on the mouse fibroblasts, the proper morphological character was stated. Agglutination, vacuolisation, nor cells membrane lysis were not observed. The number of cells separated from the matrix were identical as in the control cultures. The increased number of the dead cells and decreased proliferation of the cells in the cultures containing the chitin extracts, were probably due to the ethylene oxide residues, which was used for sterilisation of the fibres.

The assessment of the intracutaneous reactivity of the chitin extracts showed the lack of the irritation influence and the index of primary irritation was of no importance at all.

The pathomorphological findings, included macroscopic and microscopic assessment after implantation of chitin and dibutrylchitin fibres, showed the very good biocompatibility. The healing process of both kind of fibres, included the short exudative phase, which after 14 days was followed by the proliferative phase. This last phase ended with the development of the connective tissue capsule, thickness of which was ca. 1 of the fibre diameter. After longer assessment periods (between 30 to 180 days since implantation) the connective tissue capsule around both kinds of fibres was thin, being the same thickness as single muscle fibre.

On the basis of these findings and all assessment procedure, it is stated that both kinds of fibres: chitin and dibutrylchitin, fulfill the basic requirements set up for medical devices by EN ISO 10993 (Biological evaluation of medical devices).

Piśmiennictwo

- [1] Borzemska M.: Badania porównawcze metod oznaczania działania hemolitycznego wyciągów wodnych z tworzyw sztucznych. *Polimery w Med.* 8, 2, 57-61 (1978).
- [2] Paluch D., Szosland L., Kołodziej J., Staniszevska-Kuś J., Szymonowicz M., Solski L., Żywicka B.: A biological investigation of dibutrylchitin fibres. *Engineering of Biomaterials*, 7-8, 52-60, (1999).
- [3] Solski L., Paluch D., Krzywosiński L.: Polish standardisation procedures related to biomaterials on the particular example of ISO-10993; Biological evaluation of medical devices. *Engineering of Biomaterials*, 7-8, 60-65, (1999).
- [4] Solski L., Paluch D.: Normy w biologicznej ocenie wyrobów medycznych. *Normalizacja*, 3, 6-10, (2000).
- [5] Staniszevska-Kuś J., Rutowski R., Paluch D.: Badanie odczynu tkanek na nici chirurgiczne z zastosowaniem własnej metody punktowej. *Polimery w Med.*, 27, 1-2, 3-16, (1997).
- [6] Szosland L., Szumilewicz J.: Bioaktywne właściwości dibutrylochitiny. *Postęp w chemii i zastosowaniu chityny i jej pochodnych*. Monografia, t. III, 75-80, (1997).

References

- [7] Szosland L.: Di-O-butyrylchitin in *Chitin Handbook* ed. R.A.A.Muzzarelli, M.G.Peter, 53-60 (1997).
- [8] Szosland L.: Synthesis of highly substituted butyryl chitin in the presence of perchloric acid. *J.Bioactive and Compatible Pol.* 11, 61-71 (1996).
- [9] Szosland L., Stęplewski W.: Shear viscosity of dibutrylchitin dopes and wet spinning of dibutrylchitin fibres. *Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives*, ed. Polish Chitin Soc. vol. IV, 9- 15 (1998).
- [10] Szosland L., G.E.East: The dry spinning of dibutrylchitin fibres. *J.Appl.Pol.Sci.* 58, 2459-2466 (1995).
- [11] Szosland L.: Alkaline hydrolysis of dibutrylchitin: Kinetic and selected properties of hydrolysis products. *Fibres & Textiles in Eastern Europe.* 4, 76-79 (1996).