

w skład kompleksów w osoczu. Procesowi tworzenia się skrzepu fibrynowego, czyli aktywacji krzepnięcia, przeciwdziała proces upłynniania skrzepu, czyli aktywacja fibrynolizy. Aktywacja układu krzepnięcia jest silniejsza w wyniku obecności aprotyny, inaktywatora plazminy, która zwiększa stabilność fibrynolizy.

Wnioski

1. Spongostan w kontakcie z osoczem ubogopłytkowym nie wpływa na zmianę aktywności białek układu krzepnięcia i układu fibrynolitycznego.
2. Surgicel w kontakcie z osoczem ubogopłytkowym ulega natychmiastowej degradacji i inaktywuje składniki osocza, co wywołuje ilościowe zmiany parametrów układu krzepnięcia i fibrynolizy. Działając jako inhibitor wykazuje w ten sposób właściwości antykoagulacyjne.
3. TachoComb w kontakcie z osoczem ubogopłytkowym tworzy przy swojej powierzchni skrzep, bez udziału osoczowych składników. Skład materiału spowodował zwiększenie poziomu kompleksów SCFM i Dimeru-D, a obecność aprotyny przeciwdziała szybkiemu upłynnianiu skrzepu.

BADANIA BIOLOGICZNE WŁÓKIEN Z DIBUTYRYLOCHITYNY

DANUTA PALUCH*, LIDIA SZOSLAND**, JERZY KOŁODZIEJ*,
JOLANTA STANISZEWSKA-KUŚ*,
MARIA SZYMONOWICZ*, LESZEK SOLSKI*, BOGUSŁAWA ŻYWICKA*

*ZAKŁAD CHIRURGII EKSPERYMENTALNEJ I BADANIA BIOMATERIAŁÓW KATEDRY CHIRURGII URAZOWEJ I CHIRURGII RĘKI AKADEMII MEDYCZNEJ WE WROCŁAWIU

**KATEDRA CHEMII FIZYCZNEJ POLIMERÓW
POLITECHNIKI ŁÓDZKIEJ W ŁODZI

Streszczenie

Opracowana w Katedrze Chemii Fizycznej Polimerów metoda otrzymywania dibutyrylochityny przy użyciu kwasu nadchlorowego jako katalizatora reakcji estryfikacji chityny posiada szereg zalet: jest prosta, szybka i daje powtarzalne wyniki. Metoda ta powoduje znaczną degradację chityny, jednak nadal można otrzymać produkty reakcji o dostatecznie wysokiej masie cząsteczkowej o własnościach błono- i włóknotwórczych. Szereg doskonałych własności dibutyrylochityny, takich jak dobra rozpuszczalność w popularnych rozpuszczalnikach organicznych, bioaktywność, odporność na gamma radiację, zdolność tworzenia błon, mikrosfer i włókien czynią z niej polimer o dużych możliwościach w ewentualnym stosowaniu do celów biomedycznych.

Piśmiennictwo

References

- [1] Staniszevska-Kuś J., Rutowski R., Kratochwil J., Paluch D., Szymonowicz M. Solski L. Żywicka B. Badania porównawcze materiałów do śródoperacyjnej hemostazy, Inżynieria Biomateriałów 1, 3, (1998), 17-20.
- [2] Wagner W.R. i wsp.: Comparative in vitro analysis hemostatic agents, J.Surg.Res.66(1996) 100-108.
- [3] Coln D., Horton J., Ogieden M.E. and Buja L.M. Evaluation of hemostatic agents in experimental splenic lacerations. Am. J.Surg. 145, (1983), 256-261.
- [4] Agus G. B., Bono. A. V., Olivero S., Peilowich A. Et. Al.: Hemostatic efficacy and safety of Tachocomb in surgery. Ready to use and rapid hemostatic agent. Int. Surg. 81, 3, (1996), 316-319.
- [5] Bomski H.: Podstawowe laboratoryjne badania hematologiczne. WL PZWL Warszawa 15-16, (1995), 226-309.
- [6] Pawelski S.: Diagnostyka laboratoryjna w hematologii. PZWL Warszawa 1990, 193-258.
- [7] Rodak B. Diagnostik Hematology. Chapman and Hall, Philadelphia 1995.
- [8] Kasper C.K., Ewing N. P.: Acquired inhibitors of plasma coagulation factors. J. Med. Tech. 3, (1986), 431-436.
- [9] Casu B.: Structure and biological activity of heparin, Adv.Carb.Chem. Biochem.43, (1985), 51-134.
- [10] Sawicka B.: Fibrynogen- wartość diagnostyczna wyników oznaczeń, Diagn.Lab., 34, 4, (1998), 587-595.
- [11] Jastrzębska M.: Znaczenie D-Dimerów w diagnostyce zaburzeń hemostazy. BioMerieux, sp.z.o.o.1998, 3-18.

A BIOLOGICAL INVESTIGATION OF DIBUTYRYLCHITIN FIBRES

DANUTA PALUCH*, LIDIA SZOSLAND**, JERZY KOŁODZIEJ*,
JOLANTA STANISZEWSKA-KUŚ*,
MARIA SZYMONOWICZ*, LESZEK SOLSKI*, BOGUSŁAWA ŻYWICKA*

*INSTITUTE OF EXPERIMENTAL SURGERY AND BIOMATERIALS RESEARCH, THE CHAIR AND CLINIC OF TRAUMATOLOGY AND HAND SURGERY, MEDICAL ACADEMY, WROCŁAW.

** DEPARTMENT OF PHYSICAL CHEMISTRY OF POLYMERS,
TECHNICAL UNIVERSITY OF ŁÓDŹ,

Abstract

The procedure of preparation of dibutyrylchitin using perchloric acid as a cheap and easily available catalyst of chitin esterification, evaluated at the Division of Physical Chemistry of Polymers, has a number of advantages: it is simple, quick and reproducible. This method promotes significant degradation of chitin. However, it is possible to synthesise a polymer with a molecular mass high enough to form strong films, fibres or microspheres. Butyrylation of chitin gives a high yield of easily soluble products with a degree of substitution ca 2. Excellent properties of dibutyrylchitin such as easy solubility in common organic solvents, bioactivity, resistance to gamma irradiation, ability to form films, fibres and microspheres enable its wide application in medicine. The main target of our investigation was to evaluate the biocompatibility of

Celem pracy była ocena biogodności włókien z dibutyrylochityny. Badania obejmowały:

1. Badania biologiczne wyciągów wodnych:
 - Badania działania cytotoksycznego;
 - Badania działania hemolitycznego;
 - Badanie śródskórno działanie drażniącego.
2. Badania implantacyjne:
 - Badania odczynu tkanek po implantacji do jamy otrzewnowej myszy;
 - Ocenę zmian w poziomie cytokin IL 1β i IL 6 w płynie z jamy otrzewnowej myszy po implantacji.

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że włókna z dibutyrylochityny nie wykazują działania toksycznego, nie wywołują zmian ogólnoustrojowych oraz nie wywołują istotnego wzrostu poziomu cytokin IL- 1β i IL-6 po implantacji włókien z DBCH na okres 7, 14, 21, 28 i 60 dni. Implantowane do jamy otrzewnowej, wywołują dość nasilony odczyn zapalny.

Słowa kluczowe: dibutyrylochityna, badania biologiczne *in vitro*, badania implantacyjne, interleukina 1β i 6.

Chityna szeroko rozpowszechniona w przyrodzie polisacharyd, jest praktycznie nierozpuszczalna w rozpuszczalnikach organicznych, w związku z czym jej praktyczne zastosowanie jest bardzo utrudnione. W badaniach bioaktywności chityny stwierdzono, że między innymi przyspiesza ona gojenie ran nie wywołując żadnych reakcji ubocznych w organizmie ludzkim. Chityna byłaby idealnym materiałem opatrunkowym, gdyby istniał dogodny rozpuszczalnik umożliwiający jej przetwórstwo. Opracowana w Katedrze Chemii Fizycznej Polimerów metoda otrzymywania dibutyrylochityny pośrednio rozwiązuje ten problem. Do syntezy dibutyrylochityny zastosowano chitynę krylową produkcji Instytutu Morskiego i Rybackiego w Gdyni. Produkt wyjściowy był dodatkowo oczyszczony z pozostałości węgla wapnia poprzez 2-godziną obróbkę w 2 N wodnym roztworze HCl w temperaturze pokojowej. Odłączoną chitynę myto wodą, zobojętniano roztworem wodorotlenku amoniaku, myto wodą i acetonem, odsączano i suszono. Do butyrylizacji użyto chitynę o stopniu acetylacji 0,983 lepkości istotnej (oznaczonej w roztworze N-metylopirolidonu + 5% LiCl) 18,0 dL/g). Jako medium estryfikacji chityny zastosowano mieszaninę bezwodnika masłowego i 72% kwasu nadchlorowego. Reakcję prowadzono w warunkach heterogenicznych [1-4]. Otrzymano oczyszczoną DBCH w ilości 92% produktu estryfikacji chityny.

Analiza elementarna otrzymanego produktu estryfikacji, wykazała, że zawiera on:

C - 55,75%, H - 7,50% i N - 4,10%. Teoretyczna zawartość tych pierwiastków w molu podstawowym DBCH wynosi: C - 55,98%, H - 7,29% i N - 4,08%. Otrzymane wyniki świadczą o tym, że stopień butyrylizacji badanego polimeru wynosi 2. Budowę chemiczną DBCH potwierdzono również analizą widm chityny i DBCH otrzymanych metodą spektrofotometrii w podczerwieni (RYS.1). Widma IR rejestrowano na spektrofotometrze Perkin-Elmer 2000 FT-IR [2].

Szereg doskonałych własności dibutyrylochityny, takich jak dobra rozpuszczalność w popularnych rozpuszczalnikach organicznych, bioaktywność, odporność na gamma radiację, zdolność tworzenia błon, mikrosfer i włókien czynią z niej polimer o dużych możliwościach ewentualnego zastosowania do celów biomedycznych.

Włókna z DBCH uformowano metodą mokrego przędzenia z 16,3% roztworu polimeru w DMF na zwykłym zestawie laboratoryjnym, stosowanym do przędzenia włókien wiskozowych. Otrzymane włókno charakteryzowało się

dibutyrylochityny fibres.

Our investigation included:

1. Biological properties of aqueous extracts:
 - cytotoxicological effect;
 - haemolytic effect;
 - intracutaneous reactivity test.
2. Evaluation after implantation:
 - evaluation of tissue reaction after mouse intraperitoneal implantation;
 - assessment of the changes in the level of cytokines IL 1β and IL 6 in the intraperitoneal liquids of mice after implantation.

In the conclusion we can say that the dibutyrylochitin fibres do not have any toxicological properties, they give neither local nor all body reactions. They do not cause significant increase in the level of interleukins IL- 1β or IL-6. After implantation into mouse peritoneal cavity the fibres caused fairly intense inflammation.

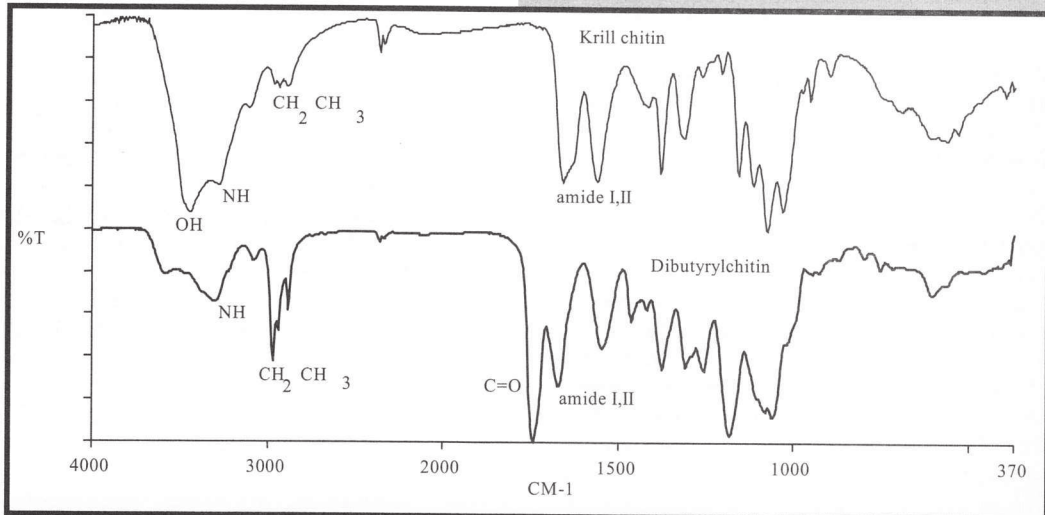
Key words: dibutyrylochitin, biological investigation *in vitro*, evaluation after implantation, interleukin 1β and 6.

Chitin, a widespread natural polysaccharide, is practically insoluble in organic solvents, so that industrial applications are very troublesome. During the evaluation of the chitin bioactivity it was found that it activated the process of wound healing without any side reactions in the human body. This natural polymer would be used as an ideal material promoting wound healing if simple methods of preparation of dressing materials from practically insoluble chitin were known. To some extent this problem was solved by a new procedure elaborated at the Department of Physical Chemistry of Polymers at Lodz Technical University. For the preparation of dibutyrylochitin, krill chitin - the product of The Sea Fisheries Institute in Gdynia - was used. The initial product was additionally purified by extraction of residual calcium carbonate by treatment of chitin powder with 2N HCl over a period of 2 h at room temperature. The chitin was next washed with water, neutralised with ammonia solution, washed again with water, acetone and dried. Butyric anhydride was used for esterification of chitin and 72 % perchloric acid was used as a catalyst of reaction conducted in heterogeneous conditions [1-4].

The yield of DBCH dried in a hot-air stream was 92 %. Elemental analysis of the obtained chitin ester gave C - 55.75%, H - 7.50% and N - 4.10%; theoretical values calculated for dibutyrylochitin are: C - 55.98%, H - 7.29% and N - 4.08%. The obtained results suggested that the degree of chitin butyrylation was equal to 2. Chemical structure of DBCH was confirmed by infra-red (IR) spectroscopic investigations (FIG.1). IR spectra of DBCH and chitin were recorded from film samples using a Perkin-Elmer 2000 FT-IR [2].

Excellent properties of dibutyrylochitin such as easy solubility in common organic solvents, bioactivity, resistance to gamma irradiation, ability to form films, fibres and microspheres enable its wide application in medicine.

DBCH fibres were prepared using 16.3% solution of polymer in DMF in a laboratory set-up. The obtained fibres had titre value of 1.86 dtex, tenacity of 14.8 cN/tex (in dry state) and elongation of 7.4% (in dry state) [3].



RYS. 1. Widma IR błonek chityny (1) i DBCH (2).

FIG. 1. IR spectra of chitin (1) and DBCH (2) films.

Metody badań

Badania wyciągów wodnych

Wyciągi wodne z badanych włókien przygotowano w oparciu o ogólne wymagania z zachowaniem w proporcji 6 g włókien na 100 ml wody badane włókna, podwójnie destylowanej. Próby inkubowano w temp. 343 K przez 24 h. Do badań biologicznych wyciągi wodne doprowadzano do izotoniczności stałym chlorkiem sodu. Jako roztwór kontrolny zastosowano wodę podwójnie destylowaną inkubowaną w tych samych warunkach co badane próby [5-7].

Pomiary laboratoryjne wyciągów wodnych

Oznaczenie pH

Pomiar pH przeprowadzono w temperaturze 293 K z zastosowaniem mikroprocesorowego miernika pH/ mV°C z automatyczną kompensacją temperatury typ P-731 produkcji polskiej, stosując typową elektrodę kombinowaną typ SAqP-301 W, krajowej produkcji [8].

Oznaczenie przewodności elektrycznej właściwej

Oznaczenie przewodności elektrycznej właściwej wykonano przy użyciu konduktometru typ N-572 produkcji polskiej z elektrodą typu PS-2Z. Przewodność elektryczną właściwą wyciągów wodnych ($\mu\text{S}/\text{cm}$) mierzono w temperaturze 293 K [9].

Oznaczenie suchej pozostałości

50 ml z każdego wyciągu zlewano do tygla kwarcowego wysuszonego do stałej masy i odparowano na łaźni wodnej. Tygiel wraz z otrzymanym osadem suszono w temperaturze 378 K do chwili, gdy różnica przy kolejnym ważeniu nie przekraczała 0,2 mg. Suchą pozostałość po odparowaniu obliczono jako różnicę między próbą badaną, a kontrolną (wynik przeliczono na 100 cm³ wyciągu) [10].

Badania biologiczne wyciągów wodnych

Badanie działania hemolitycznego

Ocenę działania hemolitycznego wyciągów wodnych przeprowadzono poprzez oznaczenie odsetka hemolizy: użyto 10% zawiesiny erytrocytów, które inkubowano z wyciągiem w temperaturze 310 K przez 24 h. Pomiary absorbancji wykonano w spektrofotometrze Marcel s 330 [11].

Methods

Aqueous extracts investigation

The aqueous extracts from the tested fibres were prepared in accordance with a general procedure, the proportions being 6 g of fibres per 100 ml of bidistilled water. The samples were incubated at the temperature of 343 K for 24 h. For biological tests the aqueous extracts were made isotonic by an addition of solid NaCl. The bidistilled water incubated under the same conditions was used as a control sample [5-7].

Laboratory measurements of aqueous extracts.

Assessment of pH

Measurements of pH were made at the temperature of 293 K with the use of microprocessor pH/mV°C-meter with an automatic temperature compensation, model P-731, made in Poland. Standard combined electrode, model SAqP-301, of Polish make was used [8].

Electrical conductivity

The measurements of electrical conductivity were carried out with a conductometer, model N-572, Polish make, with an electrode model PS-2Z. The electrical conductivity of aqueous extracts ($\mu\text{S}/\text{cm}$) was measured at the temperature of 293 K [9].

Dry residue.

A 50ml sample of each aqueous extract was put into a quartz crucible dried to constant weight and was evaporated in a water bath. The crucible containing the residue was dried at the temperature of 370 K to the point when the weighing difference did not exceed 0.2 mg. The dry residue, after evaporation, was calculated as difference between the tested and control sample and results were recalculated for 100 cm³ of the extract [10].

Biological evaluation of aqueous extracts.

Haemolytic effect.

The evaluation of haemolytic effect was carried out by assigning the haemolytic proportions. The 10% suspension of erythrocytes, incubated together with the extracts at the temperature of 310 K over the period of 24h, was used. Absorbance was measured using the Marcel S 330 spectrophotometer [11].

Badanie działania toksycznego na plemniki buhaja

Badania przeprowadzono stosując nasienie buhaja mrożone w ciekłym azocie. 0,1 cm³ (zawierający około 10 mln plemników) mrożonego nasienia rozmrażano w 1 cm³ badanego wyciągu wodnego i w 1 cm³ roztworu kontrolnego podgrzanych do temperatury 312 K [12]. Ocenę przeprowadzono porównując czas przeżycia plemników w próbie badanej i kontrolnej według następującej skali:

„-” brak działania toksycznego (różnica pomiędzy czasem przeżycia plemników w próbie i kontroli równa i mniejsza od 15%).

„+” małe działanie toksyczne (różnica pomiędzy czasem przeżycia plemników w próbie i kontroli większa od 15% i równa lub mniejsza od 20%).

„++” duże działanie toksyczne (różnica pomiędzy czasem przeżycia plemników w próbie i kontroli większa od 20%).

Badanie odczynowości śródskórnej

Badanie przeprowadzono na królikach rasy Albinos, o wadze około 3kg. Uprzednio wydepilowanym na grzbiecie zwierzętom wstrzykiwano śródskórnie po lewej stronie kręgosłupa w 5 miejscach po 0,2 ml badanego wyciągu wodnego, a po stronie prawej w 5 miejscach po 0,2 ml roztworu kontrolnego. Zmiany zabarwienia skóry oraz wielkość odczynu w miejscach wstrzyknięć oceniano po 24, 48 i 72 godzinach [13].

Badania implantacyjne

Badania odczynu tkanek i ocenę poziomu cytokin po implantacji włókien z dibutyrylochityny (sterylizacja - tlenek etylenu) przeprowadzono w porównaniu do nici Maxon prod. Davis+Geck.

Badanie odczynu tkanek

Operacje przeprowadzono na sześćdziesięciu - 10 tygodniowych myszach szczepu BALB/C, samicach o wadze około 20 g. Zabiegi wykonywano w znieczuleniu eterowym. Do jamy otrzewnowej implantowano włókna DBCH i nici chirurgiczne Maxon 4/0 w postaci pętli o masie 0,13 g. Badania patomorfologiczne przeprowadzono po 7, 14, 21, 28 i 60 dniach po implantacji. Preparaty do oceny mikroskopowej barwiono hematoksyliną i eozyną [14].

Badanie poziomu cytokin IL-1 β i IL-6

Poziom cytokin w płynie z jamy otrzewnowej myszy oceniano 7, 14, 21, 28 i 60 dnia po implantacji włókien z DBCH, w porównaniu do zwierząt, którym implantowano nici Maxon oraz do zwierząt poddanych zabiegowi otwarcia i zamknięcia jamy otrzewnowej bez implantacji materiału oraz do zwierząt zdrowych. Do oceny zastosowano test Endogen Mouse Interleukin-1 β i 6 Elisa [15].

Wyniki badań

Wyciągi wodne

Wyniki pomiarów laboratoryjnych wyciągów wodnych

Otrzymane wyciągi wodne były bezbarwne, klarowne i bez zapachu. Średnia wartość pH wyciągów z DBCH była poniżej zakresu normy 5,5-7,5 jednostek pH. Średnia wartość przewodności elektrycznej właściwej oraz suchej pozostałości mieściły się w granicach normy. Wyniki pomiarów laboratoryjnych wyciągów wodnych przedstawiono w TABELI 1.

Wyniki badań biologicznych

W badaniach biologicznych in vitro wyciągów wodnych nie stwierdzono ich działania hemolitycznego na erytrocyty ludzkie oraz cytotoksycznego na spermatozoidy buhaja. Wyniki badań przedstawiono w TABELI 2.

The evaluation of toxic influence on bull's spermatozoons

The investigation was conducted with the use of the bull sperm frozen in liquid nitrogen. The sample of 0,1 cm³ of the semen (containing approx. 10 million of spermatozoons) was defrozen in 1cm³ of tested extract and 1 cm³ of control extract, both warmed up to the temperature of 312 K [12]. The evaluation was carried out by comparing the survival times of spermatozoons in the tested and control samples by assigning the following symbols:

(-) - lack of toxic effect (the difference in survival time did not exceed 15%)

(+) - low toxic effect (the difference in survival time between 15% and 20%)

(++) - strong toxic effect (the difference in survival time higher than 20%)

Intracutaneous reactivity test

This test was carried out on the albino rabbits of the average weight of 3 kg. The skin was prepared by hair depilation and proper disinfecting. On the left side the intracutaneous injection of 0.2 ml of tested extract was made in five points. The right side was used for the control injection in the same way. The changes in skin colour and its reaction in the injection places were estimated after 24, 48 and 72 hours [13].

Evaluation after implantation

Evaluation of the tissue reaction and the level of interleukins after implantation of DBCH fibres (sterilised with ethylene oxide) was done in comparison with the Maxon sutures (D&G, Cyanamid Co., USA).

Evaluation of tissue reaction after implantation

The surgery was carried out on the 60 female mice of the BALB/C breed at the age of 10 weeks and average weight of 20g in general ether anaesthesia. Loops of DBCH fibres and Maxon sutures weighing approx. 0.13g were implanted into peritoneal cavity. The pathomorphological evaluation was done 7, 14, 21, 28 and 60 days after implantation. Specimens for microscopic studies were prepared with the H&E method [14].

Assessment of interleukins IL 1 β and IL 6

The level of interleukins in the mice intraperitoneal liquid was determined 7, 14, 21, 28 and 60 days after the implantation of DBCH fibres and compared with the results obtained for animals after implantation of the Maxon sutures and for the control animal group which underwent the same surgical procedure without implantation and for the second control group of healthy animals. The Endogen Mouse Interleukin-1 β and 6 Elisa tests were used in this study [15].

Results

Aqueous extracts

Results of laboratory measurements

The obtained aqueous extracts were colourless, clear and odourless. The mean pH of aqueous extracts of DBCH was under the standard range of 5.5-7.5 pH. The mean values of electrical conductivity and dry residue were within the standard limits. The results are shown in TABLE 1.

Results of biological evaluation

In the "in vitro" biological evaluation of aqueous extracts, neither the haemolytic effect on human erythrocytes nor the cytotoxic influence on bull spermatozoons was stated. The results are shown in TABLE 2.

Wyciąg z DBCH Extract from DBCH	pH	Przewodność elektryczna Electrical conductivity [μScm^{-1}]	Sucha pozostałość Dry residue [g]
1	4,98	41,0	0,0066
2	5,02	38,0	0,0008
3	5,05	26,0	0,0033
średnia/mean	5,01	35,0	0,0036
kontrola/control	6,25	3,0	-

TABELA 1. Wyniki badań laboratoryjnych.

TABLE 1. Results of laboratory tests of aqueous extracts.

Wyciąg z DBCH Extract from DBCH	Działanie hemolityczne Haemolytic effect [%]	Działanie cytotoksyczne na plemniki buhaja Toxic influence on bull's spermatozoons		
		Czas przeżycia w próbce Survival time in the sample [min]	Różnica pomiędzy czasem przeżycia w próbce i kontroli Difference in survival time [%]	Stopień toksyczności Toxicological level
1	0,68	70	12,5	brak/lack
2	0,70	80	0,0	brak/lack
3	0,60	75	6,25	brak/lack
średnia/mean	0,66	75	6,25	brak/lack
kontrola/control	-	80	-	-

TABELA 2. Wyniki badań biologicznych in vitro wyciągów wodnych.

TABLE 2. Results of biological tests in vitro of aqueous extracts.

Wyniki badań odczynowości śródskórnej

W miejscu iniekcji wyciągów z DBCH w dwóch miejscach zaobserwowano łagodny rumień, który utrzymywał się przez 48 godzin. Obliczony Wskaźnik Pierwotnego Drażnienia wyciągów był bez znaczenia. Iniekcja badanych wyciągów nie wywoływała stanów zapalnych skóry. Wyniki badań przedstawiono w TABELI 3.

Results of intradermal reactivity evaluation

At two injection sites of DBCH mild erythemas were observed for 48 hours. The calculated WPD of the extracts was of no importance. The injections of aqueous extracts did not cause any inflammatory changes in the skin. The results are shown in TABLE 3.

Miejsce iniekcji Injection site	Ocena śródskórnego działania drażniącego Evaluation of intradermal reactions.						Razem punktów Total points
	24 h		48 h		72 h		
	rumień erythema	obrzęk oedema	rumień erythema	obrzęk oedema	rumień erythema	obrzęk oedema	
1	1	0	1	0	0	0	2
2	0	0	0	0	0	0	0
3	1	0	1	0	0	0	2
4	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0
razem/ total	2	0	2	0	0	0	4

Wskaźnik Pierwotnego Podrażnienia = $4/15 = 0,26$

Primary irritation index = $4/15 = 0,26$

TABELA 3. Wyniki badań odczynowości śródskórnej.

TABLE 3. Results of intradermal reactivity test.

Badania makroskopowe

7 dni po implantacji włókien z dibutyrylochityny, po otwarciu jamy otrzewnowej u wszystkich sekcjonowanych myszy, stwierdzono dość silne przekrwienie całej sieci i otrzewnej trzewnej. Włókna w postaci kłębuszka oklejone były siecią. 14 dnia po zabiegu w jamie otrzewnowej obserwowano większą ilość klarownego, czerwonego płynu. 21 i 60 dni po operacji tkanka otaczająca implant była dość gruba, silnie przerastała włókna i zawsze była połączona mostkiem plazmatycznym z siecią. Pozostałe narządy jamy brzusznej jak jelita, wątroba, żołądek, śledziona nie wykazywały zmian o charakterze patologicznym (RYS.2).

RYS. 2. Obraz makroskopowy 60 dni po implantacji włókien dibutyrylochityny do jamy otrzewnowej myszy. W centrum widoczny wszczerp pokryty białoróżową tkanką.



FIG. 2. Macroscopic view 60 days after implantation of DBCH fibres into mice peritoneal cavity. The implant is in the middle covered with a pinkish-white tissue.

U wszystkich zwierząt, którym implantowano nić Maxon stwierdzono, że w odróżnieniu od włókien z DBCH, leżała ona luźno wśród jelit i z łatwością dawała się usunąć. W 7 dniu w jamie otrzewnowej stwierdzono obecność krwistosurowiczego płynu, a 14 dnia po zabiegu operacyjnym powierzchnia nici Maxon pokryta była miejscami białawą, przejrzystą bardzo cienką błoną. 21, 28 i 60 dniu wytworzona tkanka pokrywała całą powierzchnię nici, którą z łatwością można było usunąć z jamy otrzewnowej. Narządy jamy brzusznej nie wykazywały zmian o charakterze patologicznym (RYS.3).

RYS. 3. Obraz makroskopowy 60 dni po implantacji nici Maxon do jamy otrzewnowej myszy. Widoczny fragment nici pokryty przejrzystą, cienką błoną.

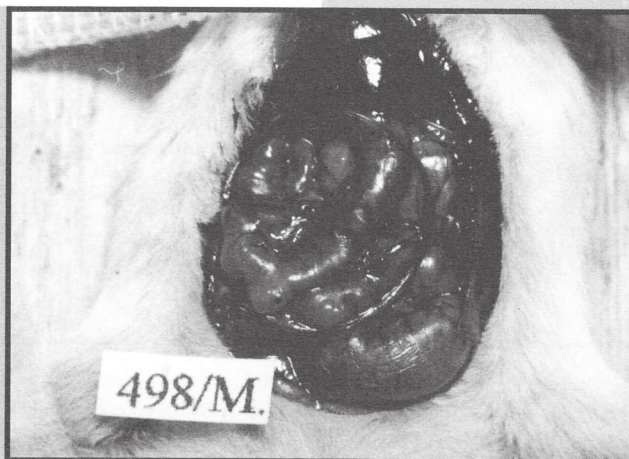


FIG. 3. Macroscopic view 60 days after implantation of the Maxon sutures into mice peritoneal cavity. The suture is covered with a thin transparent membrane.

Badania mikroskopowe

W preparatach histologicznych barwionych hematoksyliną i eozyną wykonanych 7 i 14 dni po implantacji włókien z DBCH, obserwowano ciemnoróżowe skupiska bezpostaciowe, wokół których widoczne było duże nagromadzenie makrofagów, jednojądrzastych komórek typu limfocyta oraz komórek plazmatycznych, gdzieś występowały drobne ogniska granulocytów wielopłatowych obojętnochłon-

Macroscopic evaluation

7 days after the implantation of DBCH fibres in all sacrificed mice there was significant congestion of omentum and peritoneum wall. The fibre loops were covered with the omentum. After 14 days greater volume of clear, reddish liquid were found in the peritoneal cavity. On 21st day and 60th day the tissue surrounding the implants was thick, strongly penetrated the filaments of the fibres and was connected with omentum by plasmatic bridge. Other internal organs and tissues of the sacrificed mice did show any pathological changes (FIG.2).

Loops of the Maxon sutures found in the peritoneal cavity were always loose and easy to remove. After 7 days the presence of bloody liquid in the peritoneal cavity was observed. After 14 days the Maxon sutures were partially covered with a transparent, very thin membrane. After longer implantation periods the tissue covered all the surface of the sutures. Other internal organs and tissues of the sacrificed mice did show any pathological changes (FIG.3).

Microscopic evaluation

7 and 14 days after the implantation of DBCH fibres in the histological specimens dyed by H&E method, there were dark pink amorphous conglomerates surrounded by numerous macrophages, mononuclear cells of lymphocyte type, as well as the plasmatic cells. There were also places with small quantity of polymorphonuclear neutrophils. On the edges of the sutures observed were capsules of young con-

nych. Na obrzeżach włókien widoczne były fibroblasty oraz pojedyncze fibrocyty tworzące młodą torebkę łącznotkankową. W opisywanej tkance łącznej występowały włosowate naczynia krwionośne, wypełnione elementami morfotycznymi krwi. Między poszczególnymi włóknami dibutyrylochityny obserwowano duże ilości wyługowanych erytrocytów. Brzeżne partie implantu ulegały resorpcji, a w ich miejscu obserwowano puste wakuole, ograniczone przez fibroblasty. W pobliżu pustych przestrzeni widoczne były liczne komórki olbrzymie typu ciała obcego. W obserwacjach późniejszych tj. 21, 28 i 60 dnia po zabiegu stwierdzono pomnożenie tkanki łącznej w miejscach po zresorbowanej dibutyrylochitynie (RYS.4).

RYS. 4. Obraz mikroskopowy 60 dni po implantacji dibutyrylochityny do jamy otrzewnowej myszy. Widoczne miejsca po zresorbowanych włóknach wypełnione luźną tkanką łączną (H&E, 140x).

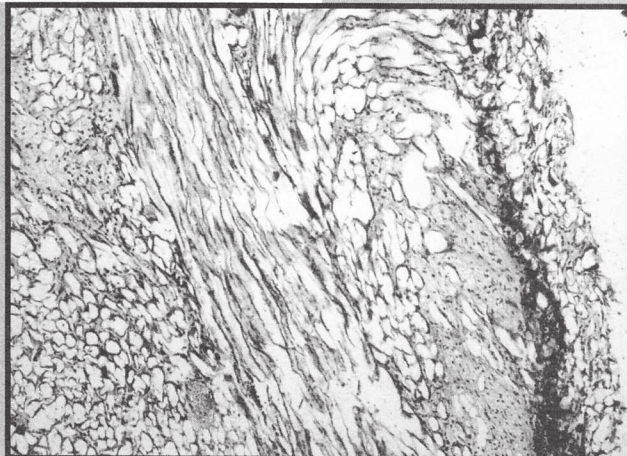


FIG. 4. Microscopic view 60 days after implantation of DBCH fibres into mice peritoneal cavity. The sites after absorbed sutures are filled with a connective tissue (H&E, 140x).

7 i 14 dni po implantacji nici Maxon w preparatach widoczne były ogniskowe nagromadzenia komórek jednojądrzastych typu limfocyta oraz niewielkie ilości wysięku włóknikowego.

21, 28 i 60 dnia widoczne były przekroje nici otoczone cienkim pasmem tkanki łącznej, nie przekraczającej 1 średnicy nici (RYS.5).

In the specimens prepared 7 and 14 days after the Maxon suture implantation there were local agglomerates of mononuclear cells of lymphocyte type as well as small volumes of fibrin exudate. After 21, 28 and 60 days the fibres were surrounded by a thin layer of connective tissue, which thickness did not exceed 1 suture diameter (FIG.5).

Interleukin levels in the liquid from mice peritoneum cavity

RYS. 5. Obraz mikroskopowy 60 dni po implantacji nici Maxon. Przekrój nici otoczonej pasmem tkanki łącznej (H&E, 160x).

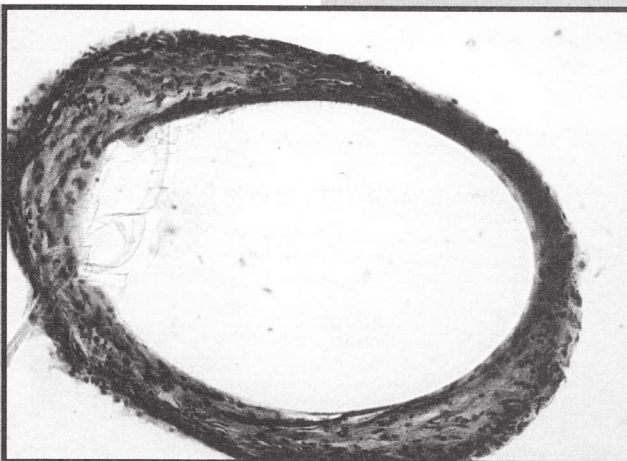


FIG. 5. Microscopic view 60 days after implantation of the Maxon suture. The cross-section of the suture covered with a connective tissue is seen (H&E, 160x).

Wyniki badań poziomu cytokin

Wyniki badań poziomu cytokin w jamie otrzewnowej poddano analizie statystycznej z zastosowaniem programu Statistica 5.0. Przyjęto poziom istotności $p < 0,05$.

Na podstawie badań przeprowadzonych 7 dnia po zabiegu nie stwierdzono istotnego wzrostu poziomu IL-1 β w grupie zwierząt z implantowanymi włóknami z DBCH i niciami Maxon w porównaniu do kontrolnej grupy operacyjnej. W 14 i 21 dobie nastąpił istotny wzrost poziomu IL-1 β zarówno w grupie z DBCH jak i w grupie z Maxonem. W terminach późniejszych poziom IL-1 β nie różnił się statystycznie od grup kontrolnych.

The determined interleukin levels were statistically analysed with the use of programme Statistica 5.0. The adopted significance level, p , was < 0.05 .

The assessment done on 7th day did not show any significant increase of the level of IL-1 β in the animal group with the implanted DBCH fibres or the Maxon sutures, in comparison with the level observed in the control group after the surgery. An important increase of the IL-1 β level was stated after 14 and 21 days in both groups with implanted DBCH fibres and Maxon sutures. After longer periods the level of IL-1 β was not statistically different from that of both control groups.

Poziom IL-6 w grupie zwierząt z niciami Maxon był statystycznie wyższy niż w kontrolnej grupie operacyjnej w 7, 14 i 21 dobie po implantacji. W 28 i 60 dobie nastąpił spadek poziomu IL-6 i nie różnił się on statystycznie od poziomu IL-6 w kontrolnej grupie operacyjnej. W grupie zwierząt z implantowanymi włóknami z DBCH istotny wzrost IL-6 stwierdzono 14, 21 i 60 dnia po implantacji. Wyniki badań przedstawiono w TABELI 4 i 5.

Omówienie wyników badań

Korzystne własności fizyczne i chemiczne dibutyrylochityny tj. własności błono- i włóknotwórcze, dobra rozpuszczalność w rozpuszczalnikach organicznych, bioaktywność i odporność na gamma radiację zachęciła nas do przeprowadzenia badań biologicznych. Badania te miały na celu ocenę przydatności dibutyrylochityny jako materiału medycznego.

W badaniach biologicznych wyciągów wodnych włókien z DBCH stwierdzono, że nie wywołują one działania hemolitycznego, cytotoksycznego i śródskórnego działania drażniącego.

W badaniach biodegradacji dibutyrylochityny w obecności lizozymu stwierdzono, że proces ten zachodzi na powierzchni włókna z bardzo małą szybkością, a jej mechanizm polega na odrywaniu krótkich łańcuchów od makrocząstek polimeru [16]. Na tej podstawie do kontrolnych do badań implantacyjnych wybrano nici Maxon o przedłużonym okresie resorpcji.

W badaniach poziomu interleukin IL-1 β i IL-6 nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy grupami zwierząt z włóknami z DBCH i niciami Maxon. Jedynie utrzymująca się w 60 dobie po implantacji istotna różnica w poziomie IL-6, spowodowana jest prawdopodobnie toczącym się procesem biodegradacji włókien z DBCH.

W badaniach patomorfologicznych stwierdzono różnice ilościowe i jakościowe odczynu tkanek. Włókna z dibutyrylochityny w okresie 60 dni po implantacji wywoływały miejscowy, dość nasilony, przewlekły, nieswoisty odczyn zapalny. Charakteryzował się on wydłużoną fazą wysiękowo-komórkową występującą przez cały okres w pobliżu niezresorbowanych włókien. Faza proliferacyjna rozpoczyna się już w 7 dniu po implantacji i trwa przez cały okres badań. Powstała młoda tkanka łączna wypełniała miejsca po nierównomiernie resorbującej się dibutyrylochitynie. W tkance tej oprócz fibroblastów, fibrocytów i ogniskowo nagromadzonych komórek zapalnych (granulocyty, makrofagi, limfocyty) występują w dużej ilości komórki olbrzymie typu ciała obcego. W odróżnieniu od włókien z DBCH nici Maxon wgajają się poprzez krótkotrwałą i mało nasiloną fazę wysiękową trwającą około 14 dni. W 14 dniu wytwarza się wokół nich cienka torebka łącznotkankowa, w której nie stwierdzono komórek zapalnych.

Tak istotne różnice w odczynie tkanek obu materiałów, prawdopodobnie spowodowane są różnym czasem i charakterem resorpcji. Problem ten może być wyjaśniony poprzez przeprowadzenie badań odczynu innych tkanek w terminach odległych, tj. dłuższych niż 60 dni, aż do momentu całkowitej resorpcji włókien z dibutyrylochityny.

In general the levels of IL-6 in the animal group with implanted Maxon sutures were statistically higher than in the control group after surgery, 7, 14 and 21 days after the implantation. After 28 and 60 days the level of IL-6 decreased and was not statistically different from that of the control group after surgery.

The group of animals with implanted DBCH fibres showed a significant increase in the IL-6 level 14, 21 and 60 days after the implantation. The results are shown in TABLES 4 and 5.

Summary

The beneficial physical and chemical properties of dibutyrylchitin, such as membrane and fibre inductivity, good solubility in organic solvents, bioactivity and resistance to gamma irradiation, have encouraged us to undertake its biological evaluation. The aim of this investigation was to assess the usefulness of dibutyrylchitin as a medical material.

During the biological evaluation of aqueous extracts of DBCH fibres we have confirmed that they give neither haemolytic nor cytotoxic reaction nor intradermal irritation effects.

In the initial evaluation of biodegradation of DBCH in presence of lysozyme it has been found that the degradation process is slow and limited to the surface layer of the fibre. It consists in separation of short chains from the macromolecule of the polymer. Therefore the Maxon sutures characterised by a prolonged resorption time were selected as control samples for the implantation.

The levels of IL-1 β and IL-6 did not show any significant differences in the groups of animals with the implanted DCBH fibres and Maxon sutures. The significant differences in the level of IL-6 observed 60 days after the implantation are probably caused by the biodegradation process.

In the pathomorphological evaluation some quantitative and qualitative differences were stated in the tissue reaction. After 60 days the DBCH fibres caused local non-specific prolonged inflammatory reaction. It was characterised by a prolonged fibroplasia-proliferative phase, which lasted all the time around the non-absorbed fibres. The proliferative phase started 7 days after the implantation and lasted all the investigated time. The developed young connective tissue filled the empty spaces after resorption of DBCH. In this tissue, apart from fibrocytes and fibroblasts and conglomerates of inflammatory cells, there were numerous cells of the foreign-body type. Unlike DBCH fibres, the Maxon sutures healed through short and low-intensity exudative phase, lasting 14 days. After that the sutures were surrounded by a thin capsule of connective tissue which did not contain any inflammatory cells.

The important differences in the reaction of tissues after the implantation of both materials are probably caused by different time and character of resorption. This hypothesis can be verified in further studies of tissue reaction after time intervals longer than 60 days up to complete resorption of DBCH fibres.

- [1]. L.Szosland, G.Janowska: Sposób otrzymywania dibutyrylochityny. Patent PL 169077 B1 (1996).
- [2]. L.Szosland: Synthesis of highly substituted butyrylchitin in the presence of perchloric acid. *J.Bioactive and Compatible Pol.* 11, (1996), 61-71.
- [3]. L.Szosland, W.Stęplewski: Shear viscosity of dibutyrylchitin dopes and wet spinning of dibutyrylchitin fibres. *Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives*, ed. Polish Chitin Soc. vol. IV, (1998), 9- 15.
- [4]. L.Szosland L.: Alkaline hydrolysis of dibutyrylchitin: Kinetic and selected properties of hydrolysis products. *Fibres & Textiles in Eastern Europe.* 4, (1996), 6-79.
- [5]. Achmatowicz T., Mazurek A.P.: Stan prawny, wymagania oraz sposoby postępowania w procesie rejestracji lub dopuszczenia do stosowania materiałów medycznych. Zastosowanie polimerów w nowoczesnych technikach medycznych. *Materiały Seminarium, Ustroń*, (1997).
- [6]. Biologiczna ocena wyrobów medycznych. Ocena i badania. Norma ISO 10993-1, (1997).
- [7]. Biologiczna ocena wyrobów medycznych. Badania cytotoksyczności; metody in vitro. Norma ISO 10993-5, ([1992).
- [8]. Polska Norma 86/C-04963: Oznaczenie pH wodnych roztworów produktów chemicznych.
- [9]. Polska Norma 76/C-89291: Oznaczenie przewodności elektrycznej - właściwej wyciągu wodnego.

- [10]. Polska Norma 91/2-55202 : Oznaczenie suchej pozostałości.
- [11]. Borzemska M. : Badania porównawcze metod oznaczania działania hemolitycznego wyciągów wodnych z tworzyw sztucznych. *Polimery w Med.* 8, 2, (1978), 57-61.
- [12]. Paluch D. :Badania porównawcze in vitro działania toksycznego wyciągów wodnych z tworzyw sztucznych w testach biologicznych na żywych komórkach. *Polimery w Med.*12, 3-4, (1981), 79-119.
- [13]. Biologiczna ocena wyrobów medycznych. Badania działania drażniącego i uczulającego. Norma ISO 10993-10. (1995).
- [14]. Staniszevska-Kuś J., Rutowski R., Paluch D.: Badanie odczynu tkanek na nici chirurgiczne z zastosowaniem własnej metody punktowej. *Polimery w Med.*, 27, 1-2, (1997), 3-16.
- [15]. Misterka S., Paluch D., Żywicka B., Staniszevska-Kuś J., Pobiedzińska J.: Zmiany w poziomie interleukiny-1- β i interleukiny-6 po implantacji wybranych materiałów medycznych. *Doniesienie wstępne. Polimery w Med.*, 28, 1-2, (1998), 15-24.
- [16]. Szosland L., Szumilewicz J.: Bioaktywne właściwości dibutyrylochityny. Postęp w chemii i zastosowaniu chityny i jej pochodnych. *Monografia, t.III.* (1997), 75-80.

KRAJOWE PROCEDURY NORMALIZACYJNE DOTYCZĄCE BIOMATERIAŁÓW NA PRZYKŁADZIE NORMY ISO-10993: BIOLOGICZNA OCENA WYROBÓW MEDYCZNYCH

LESZEK SOLSKI*, DANUTA PALUCH*,
LESZEK KRZYWOSIŃSKI**

*ZAKŁAD CHIRURGII EKSPERYMENTALNEJ I BADANIA
BIOMATERIAŁÓW
AKADEMII MEDYCZNEJ WE WROCŁAWIU

**POLSKI KOMITET NORMALIZACYJNY, ZESPÓŁ ZAGADNIEŃ
OGÓLNYCH, OCHRONY ZDROWIA I ŚRODOWISKA W WARSZAWIE

W oparciu o ustawę z kwietnia 1993 roku, z dniem 1 stycznia 1994 roku wprowadzone zostały zmiany w systemie normalizacji w Polsce, zgodne z zaleceniami Unii Europejskiej. Jednostką podstawową stał się Polski Komitet Normalizacyjny (PKN), powoływany i nadzorowany przez premiera. W ramach PKN ustanowione zostały Normalizacyjne Komisje Problemowe (NKP), których zadaniem jest prowadzenie bezpośrednich prac normalizacyjnych w określonej grupie tematycznej. Przykładem takiej struktury jest NKP nr 247 - zajmująca się materiałami medycznymi i biomateriałami. Aktualnie członkami tej komisji pozostaje 26 osób reprezentujących różne środowiska naukowe z terenu całego kraju.

POLISH STANDARISATION PROCEDURES RELATED TO BIOMATERIALS ON THE PARTICULAR EXAMPLE OF ISO-10993: BIOLOGICAL EVALUATION OF MEDICAL DEVICES

LESZEK SOLSKI*, DANUTA PALUCH*,
LESZEK KRZYWOSIŃSKI**

*INSTITUTE OF EXPERIMENTAL SURGERY AND BIOMATERIALS
RESEARCH

WROCLAW UNIVERSITY OF MEDICINE

** POLISH COMMITTEE FOR STANDARDIZATION,
DEPT. OF HEALTH AND ENVIRONMENTAL PROTECTION

Following the law created by Polish Parliament in April 1993, since the 1st January 1994, a number of important changes were introduced in standardisation procedures in Poland, in accordance with the recommendations of EU. The Polish Committee for Standardisation was established under a direct supervision of the Prime Minister. Within this general body there were established several sub-committees known also as working groups (NKP), each dealing with one particular subject or a complex of related subjects. The working group no 247 was established for biomedical devices and biomaterials. At present there are 26 active members of that body, representing different scientific institutions from all over the country. The main target of that workshop group is to translate, to adopt and to publish as Polish Standard (PN) different International Standards