

WSTĘPNE BADANIA BIOKOMPATYBILNOŚCI POLIURETANÓW OTRZYMANÝCH Z UDZIAŁEM SYNTETYCZNEGO POLIHIDROKSÝMAŚLANU

JOANNA BRZESKA^{1*}, HELENA JANIK², MAREK KOWALCZUK³,
MARIA RUTKOWSKA¹

¹AKADEMIA MORSKA W GDYNI,
KATEDRA CHEMII I TOWAROZNAWSTWA PRZEMYSŁOWEGO,
UL. MORSKA 83, 81-225 GDYNIA

²POLITECHNIKA GDAŃSKA, KATEDRA TECHNOLOGII POLIMERÓW,
UL. NARUTOWICZA 11/12, 80-952 GDAŃSK

³POLSKA AKADEMIA NAUK,
CENTRUM MATERIAŁÓW POLIMEROWYCH I WĘGLOWYCH,
UL. SKŁODOWSKA-CURIE 34, 41-800 ZABRZE

* E-MAIL: ASIAB@AM.GDYNIA.PL

Streszczenie

Zastosowanie w syntezie poliuretanów niemal zupełnie amorficznego ataktycznego poli([R,S]-3-hydroksmaślanu), bliskiego stanu, w jakim polihydroksmaślan naturalnie występuje w komórce, prowadzi do otrzymania biokompatybilnego i biodegradowalnego materiału dla zastosowań medycznych.

Celem pracy było oznaczenie sorpcji oleju, ekstrakcja wodą i heksanem poliuretanów otrzymanych z udziałem poli([R,S]-3-hydroksmaślanu) oraz ich wpływu na parametry krwi. Wysoka sorpcja oleju roślinnego przez próbki poliuretanów otrzymane z udziałem PTMG i poli([R,S]-3-hydroksmaślanu) oraz przebieg widm FTIR po ekstrakcji heksanem wskazują na potencjalną podatność tych polimerów na działanie tłuszczu w organizmie żywym. Nieznaczny tylko wpływ na parametry krwi, oznaczony przez porównanie wartości parametrów hematologicznych pełnej krwi po kontakcie z próbkami polimerów z próbką kontrolną, wskazuje na celowość dalszych badań w kierunku oznaczenia potencjalnej hemokompatybilności otrzymanych poliuretanów.

[Inżynieria Biomateriałów, 106-108, (2011), 65-72]

Wprowadzenie

Materiały polimerowe są powszechnie stosowane w medycynie ze względu na ich wyjątkowe właściwości. Poliuretany (PUR) – to jedna z najważniejszych grup polimerów, charakteryzująca się unikalną, segmentową (domeny giętkie i sztywne) strukturą [1-4]. Regularność i uporządkowanie domen oraz mikrofazowa separacja segmentów giętkich i sztywnych determinują właściwości mechaniczne i fizyczne poliuretanów, a także ich biokompatybilność. Od wczesnych lat 80-tych ubiegłego wieku prowadzone są badania oddziaływania poliuretanów na krew.

Biokompatybilność jest jednym z głównych parametrów, określających funkcjonalność materiału w medycynie. Jedną z metod otrzymania materiału kompatybilnego z ustrojem jest zastosowanie w jego syntezie związków, naturalnie występujących w organizmie lub też degradujących do produktów naturalnych, np. polihydroksmaślanu [5,6].

PRELIMINARY INVESTIGATIONS OF BIOCOMPATIBILITY OF POLYURETHANES BASED ON SYNTHETIC POLYHYDROXYBUTYRATE

JOANNA BRZESKA^{1*}, HELENA JANIK², MAREK KOWALCZUK³,
MARIA RUTKOWSKA¹

¹GDYNIA MARITIME UNIVERSITY, DEPARTMENT OF CHEMISTRY,
83 MORSKA STREET, 81-225 GDYNIA, POLAND

²GDAŃSK UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,
DEPARTMENT OF POLYMER TECHNOLOGY,
11/12 NARUTOWICZA STREET, 80-952 GDAŃSK, POLAND

³POLISH ACADEMY OF SCIENCES,
CENTRE OF POLYMER AND CARBON MATERIALS,
34 SKŁODOWSKA-CURIE STREET, 41-800 ZABRZE, POLAND

* E-MAIL: ASIAB@AM.GDYNIA.PL

Abstract

Using in polyurethanes synthesis almost completely amorphous, atactic poly([R,S]-3-hydroxybutyrate) which is close to its original state in the cell, ought to let to obtain biocompatible and biodegradable material useful for medical application.

The aim of work was to measure of oil sorption by obtained polyurethanes, based on poly([R,S]-3-hydroxybutyrate), and their water and hexane extraction and the estimation of their influence on blood parameters. The high oil sorption by polyurethane samples synthesized with polyoxytetramethylene diol and poly([R,S]-3-hydroxybutyrate) in soft segments and FTIR spectra of dry residue after hexane extraction indicate on potential susceptibility of those polyurethanes to lipids in living organism. Insignificant influence on blood parameters, estimated by comparison of values of hematologic parameters of whole blood contacted to polymers' samples and control probe indicate on purposefulness of further tests to verify the hemocompatibility of obtained polyurethanes.

[Engineering of Biomaterials, 106-108, (2011), 65-72]

Introduction

Polymeric materials are widely used in biomedical applications due to their desired properties. Among these, polyurethanes (PUR) are one of the most important classes of polymers because of their unique segmented (hard and soft domains) structure [1-4]. Regularity and ordering of domains determine the mechanical and physical properties of PURs. It is known that blood compatibility is related to microphase separated structure of hard and soft segment. The first significant studies on the blood response characteristics of polyurethanes were reported in the early 1980s.

The biocompatibility is the major parameter which determined the functional quality. One of the methods of obtaining biocompatible material is using substrates, which naturally exist in human organism or degrade into natural products, like polyhydroxybutyrate (PHB) [5,6].

Polihydroksymaślan jest biokompatybilnym poliestrem, naturalnie syntezowanym przez wiele mikroorganizmów, jako materiał zapasowy. Produkt jego degradacji – kwas 3-hydroksymaślowy – powszechny metabolit krwi ludzkiej, produkowany jest w ciałach ketonowych ssaków podczas przedłużającej się głodówki [7]. Kwas 3-hydroksymaślowy należy do krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych, wykazujących właściwości antybakteryjne [8]. Chemicznie otrzymanym substytutem naturalnego polihydroksymaślanu jest ataktyczny poli([R,S]-3-hydroksymaślan) (a-PHB).

Zastosowanie w syntezie poliuretanów niemal zupełnie amorficznego a-PHB, bliskiego stanu, w jakim polihydroksymaślan naturalnie występuje w komórce, prowadzić może do otrzymania biokompatybilnego i biodegradowalnego materiału dla zastosowań medycznych.

Jest ogólnie przyjęte, że powtarzalne i niedrogie testy *in vitro* stanowią istotny etap poprzedzający badania *in vivo*. Obejmują one testy cytotoxyczności (wpływ biomateriału na morfologię, żywotność oraz funkcjonalność komórek) i oznaczenie hemokompatybilności materiału.

Celem pracy było oznaczenie sorpcji oleju, ekstrakcja wodą i heksanem poliuretanów otrzymanych z udziałem a-PHB oraz ich wpływu na parametry krwi.

Część doświadczalna

Synteza poliuretanów

Syntezę poliuretanów prowadzono metodą dwuetapową [9]. W etapie pierwszym prepolimer otrzymano w reakcji oligomerodioli z 4,4'-diizocyjanianem dicykloheksylometanu (H_{12} MDI, Alfa Aesar), wobec katalizatora – dibutylo-dilaurynianu cyny (DBTDL, Akra Chem.), przy obniżonym ciśnieniu. W syntezie użyto oligomerodioli: ataktycznego poli([R,S]-3-hydroksymaślanu) (a-PHB, $M_n=2000$, CMPiW PAN, Zabrze), polikaprolaktonodioli (PCL, $M_n=1900$, Aldrich) oraz polioksytetrametylenodioli (PTMG, $M_n=2000$, Aldrich). Stosunek molowy grup NCO:OH wynosił 3,7:1 i 2:1. Reakcja prowadzona była przy ciągłym mieszaniu w temperaturze 60-70°C w czasie 2 godz. Następnie do 40% roztworu prepolimeru w N,N-dimetyloformamidzie (DMF, Labscan Ltd) dodano przedłużacza łańcuchów – 1,4-butanodioli (1,4-BD, Aldrich), uzyskując równomolowy stosunek grup NCO:OH. Reakcję prowadzono w temperaturze 60°C w czasie 1,5 godz.

Folie poliuretanów formowano przez wylanie roztworów na płytki teflonowe i odparowanie rozpuszczalnika w 80°C. Następnie folie wygrzewano w 105°C przez 5 godz. pod próżnią i - po kilku tygodniach sezonowania w temperaturze pokojowej – umyto zimnym heksanem przez 5 godz. w aparacie Soxhleta dla usunięcia nieprzereagowanych resztek monomeru i katalizatora.

Skład poliuretanów przedstawiono w TABELI 1.

Polyhydroxybutyrate is biodegradable polyester, naturally synthesized by many microorganisms as a resource of carbon and energy. Product of its degradation – 3-hydroxybutyric acid - a common metabolite in human blood, is produced in ketone bodies of mammals during the prolonged starvation [7]. 3-hydroxybutyric acid belongs to short-chain fatty acids and reveals antibacterial activity [8]. The chemically synthesized substitute of natural PHB is atactic poly([R,S]-3-hydroxybutyrate) (a-PHB). Using in polyurethanes synthesis almost completely amorphous a-PHB, which is close to its original state in the cell, ought to let to obtain biocompatible and biodegradable material useful for medical application.

It is generally accepted that reproducible and inexpensive tests *in vitro* are essential prior to conducting *in vivo* trials. *In vitro* testing procedures are a fundamental part of biocompatibility estimation. They include cytotoxicity tests (effect of biomaterial on cell morphology, viability or function) and hemocompatibility evaluation.

The aim of work was to estimate the oil sorption by polyurethanes based on a-PHB, their water and hexane extraction and the estimation their influence on blood parameters.

Experimental

Synthesis of polyurethanes

Synthesis of polyurethanes was carried out in a two-step reaction, as reported previously [9]. First, the prepolymer was prepared from polyols and 4,4'-methylene dicyclohexyl diisocyanate (H_{12} MDI, Alfa Aesar), in a presence of catalyst - dibutyltindilaurate (DBTDL, Akra Chem.), at reduced pressure. Atactic poly([R,S]-3-hydroxybutyrate) (a-PHB, $M_n=2000$, CMPiW PAS, Zabrze), polycaprolactone diol (PCL, $M_n=1900$, Aldrich) or polyoxytetramethylene diol (PTMG, $M_n=2000$, Aldrich) were used as polyols. The molar ratio of NCO:OH groups in prepolymer was 3.7:1 and 2:1. The mixture was stirred at temperatures 60-70°C for 2 h. Then the prepolymer was dissolved in N,N-dimethylformamide (DMF, Labscan Ltd) to solid mass concentration of 40%. The chain extender 1,4-butanediol (1,4-BD, Aldrich) was added to obtain equimolar ratio NCO to OH groups and reaction proceeded at 60°C for 1.5 h.

Solution of polyurethane was poured on Teflon plates and heated at 80°C for solvent evaporation. Next, the foils were heated at 105°C in vacuum dryer for 5 h. After few weeks of seasoning at room temperature, foils were washed for 5 h in cold hexane in Soxhlet extractor for removing unreacted monomers and the rest of catalyst.

Composition of obtained polyurethanes is presented in TABLE 1.

TABELA 1. Skład poliuretanów.
TABLE 1. Composition of polyurethanes.

PUR	Skład segmentów giętkich / Composition of soft segment	Segmenty sztywne / Hard segment	NCO:OH w prepolimerze / in prepolymer
PUR-A	23% a-PHB + 77% PTMG	H_{12} MDI+1,4-BD	3.7:1
PUR-B	23% a-PHB + 77% PCL		3.7:1
PUR-C	100% a-PHB		3.7:1
PUR-D	23% a-PHB + 77% PTMG		2:1
PUR-E	23% a-PHB + 77% PCL		2:1
PUR-F	100% a-PHB		2:1

Metody

Sorpcję oleju otrzymanych poliuretanów oznaczono przez umieszczenie próbek polimerów w oleju słonecznikowym [10]. Próbki poliuretanów suszono do stałej masy w temp. 70°C w suszarce próżniowej, po czym zanurzono w oleju i umieszczano w cieplarni w temp. 37°C (temperatura fizjologiczna ciała ludzkiego) na 24 godziny. Oznaczano procentowy przyrost masy próbek ważonych bezpośrednio po odciśnięciu oleju między płatkami bibuły.

Wyciągi heksanowe przygotowano wg Farmakopei Polskiej [11]: 1,0 g badanego poliuretanu umieszczono w 50 ml heksanu i utrzymywano w temperaturze wrzenia przez 4 godziny. Oznaczono masę suchej pozostałości po odparowaniu 25 ml wyciągu. Strukturę wymytych cząstek zbadano spektrometrem FTIR - Bruker IFS 66, przy 16-krotnym skanowaniu.

Wyciągi wodne przygotowano wg wymagań Farmakopei Polskiej [11], używając proporcjonalnie 100 ml wody dejonizowanej na próbkę folii o obu stronach powierzchni 600 cm² i inkubując ją w czasie 24 godzin w temperaturze 70°C. Zmętnienie oraz pH wyciągów wodnych oznaczono, porównując z równoległe przygotowaną ślepą próbą (dejonizowana woda termostatowana w tych samych warunkach). Masę suchej pozostałości oznaczono po odparowaniu 50 ml wyciągu wodnego.

Hemokompatybilność otrzymanych poliuretanów oznaczono przez obserwację zmian parametrów morfologicznych i koagulacji pełnej krwi po jej inkubacji z próbkami PUR. Sterylne próbki folii poliuretanów (sterylizowane plazmą gazu generowanego nad H₂O₂), o powierzchni 8,5 cm², umieszczono w świeżo pobranej od trzech zdrowych kobiet krwi i poddano inkubacji w cieplarni przez 15 minut oraz 4 godziny w temperaturze fizjologicznej dla ludzkiego organizmu (37°C).

Parametry morfologiczne oznaczono, pobierając (bepośrednio przed badaniem) krew do probówek o pojemności 3 ml, zawierających EDTA jako antykoagulant. Po umieszczeniu próbki polimeru wewnątrz probówki i inkubowaniu w określonym czasie w cieplarni wykonano analizę morfologiczną metodą cytometryczną, na analizatorze hematologicznym Cell Dyn 3500.

Czas kaolinowo-kefalinowy (czas częściowej tromboplastyny po aktywacji) (APTT) w osoczu oraz stężenie fibrynogeny (parametry krzepliwości krwi) oznaczono testem fotoptycznym autoanalizatorem ACL9000 (osocze otrzymano po odwirowaniu 2 ml krwi pobranej na cytrynian sodu).

Wyniki i dyskusja

Implantowany materiał, umieszczony wewnątrz organizmu, narażony jest na działanie otaczającego go środowiska. Istotną rolę w procesie degradacji polimerów pełnią tłuszcze. Przyspieszają one kalcyfikację oraz naprężenie pęknięcie powierzchni materiału. Wpływ związków tłuszczowych na poliuretany zbadano przez pomiar sorpcji oleju roślinnego. Wyniki sorpcji oleju przedstawiono w TABELI 2. Wprowadzenie a-PHB do struktury poliuretanów spowodowało zmniejszenie sorpcji oleju przez próbki poliuretanów, zawierające PTMG w strukturze segmentów giętkich. Nie wpłynęło natomiast na sorpcję oleju przez poliuretany z półkryształicznym PCL [9]. Wartości zebrane w TABELI 2 wskazują wyraźnie, iż podatność PURs z PTMG (PUR-A i PUR-D) w segmencie giętkim na sorpcję oleju jest znacznie wyższa niż przy zastosowaniu PCL w syntezie prepolimeru (PUR-B i PUR-E).

Methods

The oil sorption of obtained polyurethanes was estimated by immersing of polymer samples in sunflower oil [10]. The polymer samples were vacuum dried at 70°C, weighted and immersed in sunflower oil at 37°C (physiological temperature of human body) for 24 hours. Subsequently the investigated samples were taken away from oil and after cleaning with paper sheets – weighted.

Hexane extracts were prepared according to Polish Pharmacopea [11]: 1 g of investigated polyurethane samples were immersed in 50 mL of boiling hexane for 4 hours. The dry mass of residue was estimated after solvent evaporation from 25 mL of hexane solution. The structure of solid residue was performed using Fourier transform infrared spectrometer Bruker IFS 66 in the range of 4000-400 cm⁻¹ for an accumulated 16 scans.

Water extracts were prepared according to Polish Pharmacopea [11] using 100 mL of deionized water for polymer sample squared 600 cm² at temperature 70°C during 24 hours of incubation. Turbidity and pH of water extracts were estimated in comparison to control probe (deionized water incubated in the same conditions). Solid residues of water extracts were estimated for 50 ml of extracts after solvent evaporation.

Hemocompatibility of obtained polyurethanes was estimated by observations of changes in morphology and coagulation parameters of whole blood after direct contact with polymer samples. The polyurethane samples (sterilized H₂O₂ plasma) squared 8.5 cm² were immersed in separate test tubes containing fresh blood taken from three, healthy women, and incubated at 37°C for 15 minutes and 4 hours. Morphologic parameters, using flow cytometry method (hematologic Cell Dyn 3500 analyzer), were estimated for blood taken to 3 mL tubes with EDTA. Whereas coagulation parameters were estimated by measuring of APTT and fibrinogen concentration (photooptical method, ACL 9000 analyzer) in blood plasma (obtained by centrifugation of 2 mL of citric blood).

Results and discussion

Material immersed in living body is exposed on acting of surrounded environment. Lipids play the very important role in degradation process of polymer material. They accelerate calcification and environmental stress cracking of polymer surface. Influence of lipids compounds on polyurethane sample was investigated by sorption of vegetables oil. The results of oil sorption are shown in TABLE 2. Introducing of a-PHB into soft segments caused the reducing of oil sorption by PURs with PTMG. There was no such influence in the case of PURs with semi-crystalline PCL [9]. The oil sorption by polyurethane samples based on PTMG (PUR-A and PUR-D) is much higher than for PURs with PCL in soft segments (PUR-B and PUR-E).

TABELA 2. Sorpcja oleju roślinnego przez poliuretany otrzymane z udziałem a-PHB.
TABLE 2. The sunflower oil sorption by polyurethanes based on a-PHB.

PUR	PUR-A	PUR-B	PUR-C	PUR-D	PUR-E	PUR-F
Sorpcja oleju (wartość±SD) [%] / Oil sorption (mean±SD) [%]	6.9± 0.28*	0.7± 0.01*	1.1± 0.27	9.6± 0.66	0.3± 0.04	1.2± 0.29

* dane przedstawione w [9], SD – odchylenie standardowe, n=3

* data presented in [9], SD – standard deviation, n=3

Znajdująca się we krwi albumina (adsorbowana na ściankach implantu stanowi jego naturalny łącznik z ustrojem) jest białkiem występującym we krwi w formie kompleksu z tłuszczami [12]. Zatem duża podatność na sorpcję oleju sprzyjać może także adsorpcji albumin, zwiększając tym samym hemokompatybilność poliuretanów z PTMG.

Próbki poliuretanu PUR-A (syntezowanego przy stosunku molowym NCO:OH = 3,7:1 w prepolimerze) zaabsorbowały mniej oleju niż próbki PUR-D (NCO:OH = 2:1). Analiza struktury otrzymanych poliuretanów wskazuje, że przy wyższym stosunku molowym NCO:OH w prepolimerze powstało więcej wiązań wodorowych [13]. Zatem wnikanie oleju w głąb polimeru było utrudnione [14].

Wyciągi wodne otrzymane z poliuretanów były bezbarwne i bez wyraźnego zapachu i nie wykazywały, w porównaniu z wodą, różnicy zmętnienia.

Masę suchej pozostałości po oddziaływaniu na próbki poliuretanów wodą i heksanem oraz pH wyciągów wodnych przedstawiono w TABELI 3.

ΔpH , wyznaczone względem pH czystej wody termostatowanej w tych samych warunkach ($pH_{\text{wody}} = 7,1$), wskazują, że wiązania estrowe a-PHB_{tel} oraz PCL uległy hydrolizie. Wartość przesunięć (ΔpH) jest podobna do wartości uzyskanej dla handlowego, o stwierdzonej biokompatybilności, poliuretanu Pellethane 80A, która wynosi 2,14 [15].

Masa suchej pozostałości, uzyskana po odparowaniu wyciągu wodnego z PUR-A, jest wyższa od dopuszczalnej przez Farmakopeę Polską wartości 15 mg, co świadczy o częściowej degradacji polimeru, przyspieszonej podwyższoną temperaturą. Może to wskazywać na podatność poliuretanu PUR-A na degradację hydrolytyczną.

Sucha pozostałość po odparowaniu rozpuszczalnika z wyciągu heksanowego pozwala wnioskować o ilości niskocząsteczkowych substancji (niezwiązanych w masie polimeru), jakie mogą ulec wymywaniu przez tłuszcze w organizmie żywym.

Na widmach FTIR otrzymanych poliuretanów zaobserwowano, przy 3400-3300 cm^{-1} , pasma drgań rozciągających, wskazujących na obecność grup -NH związanych wiązaniem wodorowym. Stwierdzono także obecność I pasma amidowego w zakresie 1740-1690 cm^{-1} oraz II pasma amidowego przy 1530-1510 cm^{-1} (dane nie prezentowane). Szczegółowy opis pasm charakterystycznych przedstawiono w [13]. Stwierdzono też powstanie wiązań wodorowych między grupami NH ugrupowania uretanowego, a grupą karbonylową estru i uretanu, a także między NH, a tlenem grupy eterowej. Więcej wiązań wodorowych między ugrupowaniami uretanowymi zaobserwowano dla poliuretanów otrzymanych przy stosunku NCO:OH = 3,7:1 w prepolimerze niż dla NCO:OH = 2:1. Ponadto stwierdzono, że wprowadzenie a-PHB do struktury poliuretanów zwiększyło nieco liczbę wiązań wodorowych typu uretan-uretan [13]. Widma FTIR suchych pozostałości po ekstrakcji poliuretanów heksanem przedstawiono na RYS. 1.

Przebieg widma FTIR suchej pozostałości PUR-A (z a-PHB i PTMG w segmencie giętkim) wskazuje na dużą podatność tego poliuretanu na działanie heksanu. Potwierdza to największa spośród wszystkich poliuretanów ilość suchej pozostałości z wyciągu heksanowego (TABELA 3). Szerokie pasmo, w obszarze 3550-3200 cm^{-1} odpowiadać może wiązaniom NH ugrupowania uretanowego lub aminowego, a także grupom OH oraz COOH powstałym po degradacji wiązań uretanowych i estrowych. Obecność zaś intensywne go pasma przy 1100 cm^{-1} potwierdza obecność w ekstrakcie ugrupowania eterowego polioksytetrametylenodiolu.

Albumina is a peptide which is absorbed on implant surface and cause the natural junction with natural environment of living body [12]. This peptide exists in organism as lipid-complex so higher oil sorption could improve the hemocompatibility of polyurethanes based on PTMG.

Samples of PUR-A (synthesized with NCO:OH = 3.7:1 in prepolymer) absorbed less oil amount than PUR-D (NCO:OH=2:1). According to structure analysis of obtained polyurethanes (presented in [13]) it was concluded that in PURs with higher NCO:OH ratio more hydrogen bonds had been formed. In this case the oil penetration into polymer structure was difficult [14].

The water extracts of investigated polyurethanes were colourless and without any fragrance. Flocculation of deionized water and extracts of polyurethanes were not differing.

The solid residues of water and hexane extracts and pH of water extract are presented in TABLE 3.

TABELA 3. Masa suchej pozostałości z ekstraktów wodnych i heksanowych oraz pH wyciągów wodnych poliuretanów z a-PHB w segmencie giętkim.

TABLE 3. The solid residues of the water and hexane extracts from PUR and pH of water extracts.

PUR	Wyciąg wodny / Extraction in water		Wyciąg heksanowy / Extraction in hexane	
	pH	ΔpH^{**}	sucha pozostałość / dry residue [mg]	sucha pozostałość / dry residue [mg]
PUR-A	4.1	-3.0	16.4	7.50*
PUR-B	6.0	-1.1	1.9	0.60*
PUR-C	-	-	-	0.35
PUR-E	-	-	-	0.80
PUR-F	4.3	-2.8	-	0.20

* dane przedstawione w [9], ** $\Delta pH = pH_{\text{ekstraktu}} - pH_{\text{wody}}$
* data presented in [9], ** $\Delta pH = pH_{\text{extract}} - pH_{\text{water}}$

ΔpH measured in comparison to deionized water, thermostated in the same conditions ($pH_{\text{water}} = 7.1$) indicate on hydrolysis of a-PHB and PCL ester bonds. ΔpH of water extracts of investigated polyurethanes are similar to ΔpH (2.14) of commercial, biocompatible polyurethane Pellethane 80A [15].

The mass of solid residue, obtained after water evaporation from PUR-A extracts, is higher than allowed in Pharmacopea (15 mg), what suggests that degradation of polymer material is accelerated by high temperature. It also

predicts the degradability of this polyurethane.

The solid residue of hexane extracts indicate on the presence of low molecular chains in polymer structure, which could be eroded by lipids in living organism.

At FTIR spectra of obtained polyurethanes the band characteristic for stretching vibrations of NH (from urethane) groups in the region of 3400-3300 cm^{-1} , the amide I band in the region 1740-1690 cm^{-1} and the amide II band in the region of 1530-1510 cm^{-1} are observed (data not shown). Detailed discussion about the characteristic band groups are presented in reference [13]. There was also concluded that the NH groups, coming from urethane groups, were forming the hydrogen bonds with carbonyl groups of ester and urethane groups and the hydrogen bonds with ether groups. In the case of the greater NCO:OH ratio in prepolymer (NCO:OH = 3.7:1), the more urethane-urethane hydrogen bonds were formed. Furthermore an addition of a-PHB caused the slight increase in number of urethane-urethane hydrogen bonds [13]. FTIR spectra of solid residues after extraction in hexane are presented in FIG. 1.

FTIR spectra of PUR-A (based on a-PHB and PTMG) dry residue indicates on susceptibility of that polyurethane to hexane. It is confirmed by the high amount of mass residue (TABLE 3). The wide band at 3550-3200 cm^{-1} suggests presence of the NH bonds (from urethane or amine groups) or OH and COOH, which were formed during degradation of urethane or ester groups. However the intensive band at 1100 cm^{-1} indicates on the presence of ether bonds (of PTMG) in solid residue.

Większa ilość suchej pozostałości po ekstrakcji poliuretanów heksanem oraz przebieg widm FTIR wskazują, że PUR z mniejszą zawartością segmentów sztywnych (NCO:OH = 2:1) – PUR-E – jest bardziej podatny na degradację i wymywanie krótkich łańcuchów polimeru niż PUR-B (NCO:OH = 3,7:1).

Niespodziewanie poliuretany, których segment giętki zbudowany był tylko z α -PHB (PUR-C and PUR-F), okazały się bardzo odporne na działanie wrzącego heksanu. Jest to wynik tym bardziej zaskakujący, że polimery te są nieodporne na działanie wyższych temperatur (szybko miękną) oraz łatwo rozpuszczają się w innych rozpuszczalnikach organicznych.

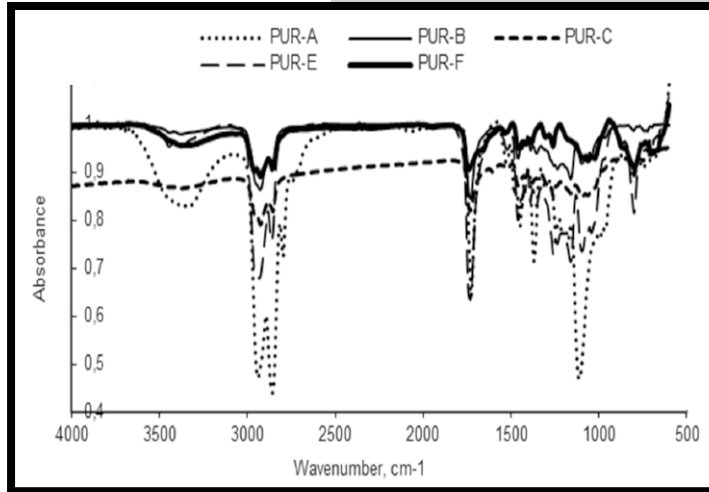
Materiał polimerowy, umieszczony w organizmie żywym, ma bezpośredni lub pośredni kontakt z komórkami krwi. Hemokompatybilność zaś jest jednym z podstawowych warunków, kwalifikujących materiał do dalszych badań nad jego bezpiecznym użytkowaniem dla celów medycznych.

Wpływ wybranych poliuretanów na wartości parametrów krwi: stężenie białych krwinek (WBC, leukocyty), stężenie czerwonych krwinek (erytrocytów) (RBC), hemoglobiny (HGB), hematokrytu (HCT) i płytek krwi (PLT) oznaczono przez porównanie z próbką kontrolną (krew nie kontaktująca się z próbką polimeru, inkubowana w takich samych warunkach). Wyniki badania oddziaływania poliuretanów na parametry krwi, po 15 minutach i 4 godzinach inkubacji w 37°C, przedstawiono na RYSUNKACH 2-6. Wartości średnie przedstawiono w postaci kolumn \pm odchylenie standardowe (n=9). Czarne linie oznaczają wartości referencyjne parametrów krwi.

Wartości parametrów hematologicznych zarówno próbek kontrolnych, jak i po kontakcie z poliuretanami, mieszczą się w zakresach wartości referencyjnych i są porównywalne dla wszystkich badanych próbek. Nie odnotowano istotnych różnic między wartościami w badanych próbkach, a próbkach kontrolnych, co wskazuje na brak hemolizy wywołanej obecnością materiału polimerowego.

Nieznaczne obniżenie stężenia białych krwinek po 4 godzinach inkubacji we wszystkich badanych próbkach może być związane z ich naturalnym rozpadem oraz adhezją do powierzchni próbki polimeru i próbówki. W pracy [16] autorzy, rejestrując zmiany kształtu krwinek pod mikroskopem elektronowym, stwierdzili ich wydłużenie i łączenie się w agregaty leukocyt – leukocyt i leukocyt - płytka krwi po kontakcie krwi z dzianiną poliestrową. Świadczy to o aktywacji białych krwinek, co jest pierwszym etapem „przystosowywania” wprowadzonego sztucznego materiału do krwi.

Jednym z najważniejszych wskaźników biogodności polimeru jest jego wpływ na liczbę płytek krwi. Obniżenie liczby płytek krwi jest częstym powikłaniem, występującym przy wprowadzeniu materiału polimerowego do organizmu [12]. Płytki krwi odpowiedzialne są za prawidłowe krzepnięcie krwi i biorą udział w początkowym etapie tworzenia układu komplementu, prowadzącego do tworzenia skrzepliny. Aktywacja komplementu, wywołana obecnością polimeru we krwi, powoduje adhezję komórek na powierzchni materiału oraz agregację i aktywację płytek krwi.



RYS. 1. Widma FTIR suchych pozostałości po ekstrakcji poliuretanów heksanem.
FIG. 1. FTIR spectra of solid residue of hexane extracts from polyurethanes.

The higher amount of solid residue and observation of FTIR spectrum suggest that polyurethane with less amount of hard segments (NCO:OH = 2:1) – PUR-E - is more susceptible to degradation and erosion of low molecular chains, than PUR-B (NCO:OH = 3.7:1).

Unexpectedly polyurethanes with soft segments built only with α -PHB (PUR-C and PUR-F) are resistant to boiling hexane. It is surprising because of their susceptibility to temperature growth (they are softening) and solubility in other organic solvents.

Polymer material, implanted into living organism, is directly or indirectly contacting with blood cells. Hemocompatibility is one of major parameters qualified material to further investigations for its safe using for medicine.

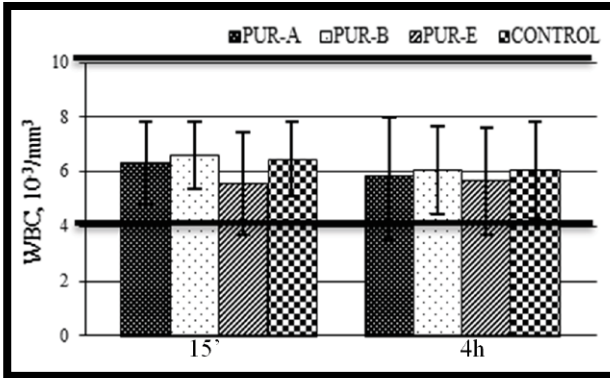
The influence of investigated polyurethanes on blood parameters: white blood cells (WBC, leucocyte), red blood cells (RBC, erythrocyte), hemoglobin (HGB), hematocrit (HCT) and platelets (PLT) was compared with control probe (blood sample, incubated in the same conditions, but has not been contacted with polymer). The results after 15 minutes and 4 hours of polymers incubation in blood are presented in FIGs 2-6. Columns represent average \pm standard deviation (n = 9). Black lines means references range.

Values of hematologic parameters before and after incubation of polyurethanes samples are in reference ranges, and are similar for all PURs. Significant differences in comparison to control probe are not observed what suggests lack of hemolysis activated by polyurethane samples presence.

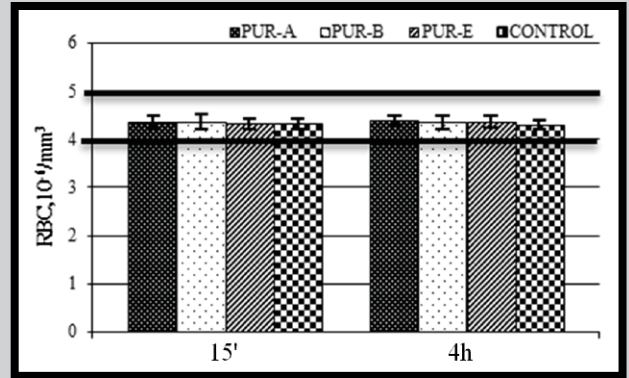
Negligible decreasing of white blood cells concentration after 4 hours of incubation for all samples is connected probably with their natural breaking-up and with adhesion to surface of the polymer sample and tube. It confirmed the literature data [16], where authors observed that white cells were elongated and joined into leucocyte-leucocyte and leucocyte-platelet aggregates after contact with polyester knit fabric. They concluded that it was the first stage of adapting of implanted polymer material to plasma environment.

The influence of polymer on platelet number is one of the most important biocompatibility coefficients. Decreasing of platelet concentration is a common complication of polymer material inserting in organism [12]. Platelets are responsible for correct blood coagulation and participate in the first stage of constituting of complement for creation of thrombus. Complement activation, connected with polymer presence in blood, causes cell adhesion on surface of material and platelet activation.

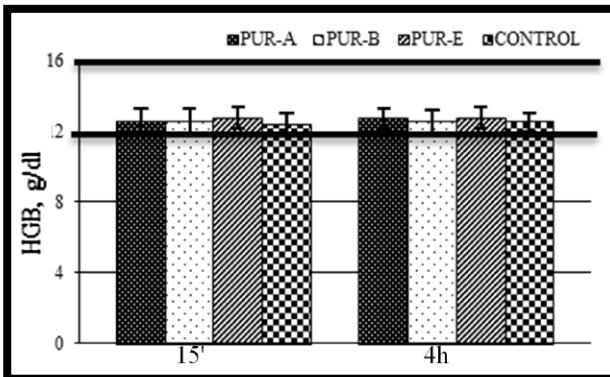
In FIG. 6 the influence of PURs samples on platelet concentration is presented. No significant changes in platelet concentration during incubation were observed. They were similar to control probe. It is supposed that complement was not activated, what was confirmed by only small decreasing of white blood cell [17].



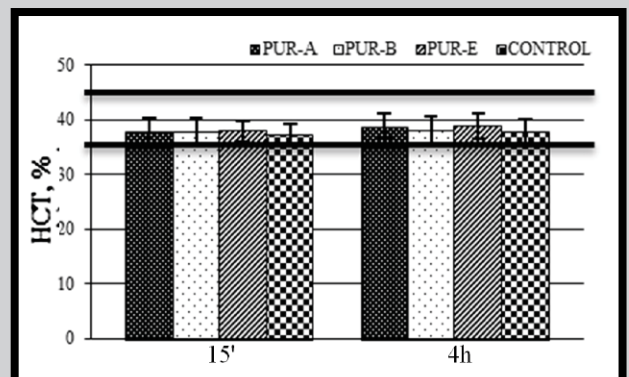
RYS. 2. Wpływ poliuretanów na stężenie białych krwinek (WBC).
FIG. 2. Influence of PURs sample on white blood cells (WBC) concentration.



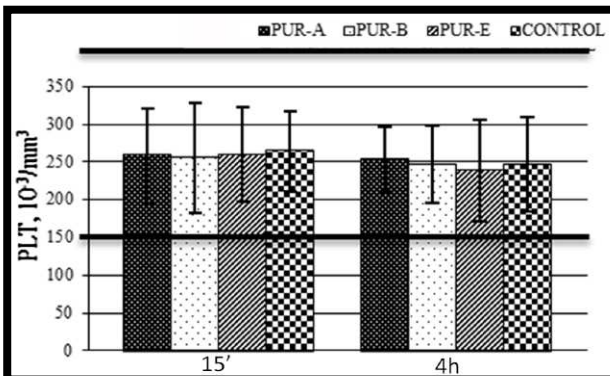
RYS. 3. Wpływ poliuretanów na stężenie czerwonych krwinek (RBC).
FIG. 3. Influence of PURs sample on red blood cells (RBC) concentration.



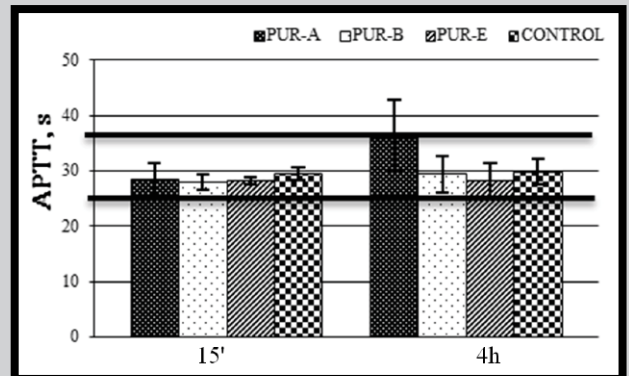
RYS. 4. Wpływ poliuretanów na stężenie hemoglobiny (HGB).
FIG. 4. Influence of PURs sample on hemoglobin (HGB) concentration.



RYS. 5. Wpływ poliuretanów na stężenie hematokrytu (HCT).
FIG. 5. Influence of PURs sample on hematocrit (HCT) concentration.



RYS. 6. Wpływ poliuretanów na stężenie płytek krwi (PLT).
FIG. 6. Influence of PURs sample on platelets (PLT) concentration.



RYS. 7. Wpływ poliuretanów na czas częściowej tromboplastyny po aktywacji (APTT).
FIG. 7. Influence of PURs sample on APTT.

Na RYS. 6 przedstawiono wpływ poliuretanów na stężenie płytek krwi. Stężenie trombocytów w badanych próbkach w nieznanym stopniu uległo obniżeniu w czasie inkubacji w cieplarni. Są to jednak niewielkie zmiany, nieodlegające od zmian w ilości płytek krwi w próbce kontrolnej. Pozwala to przypuszczać, że nie doszło do aktywacji komplementu, co jest potwierdzone brakiem znacznego obniżenia stężenia białych krwinek [17].

During the first minutes after the implant immersion in living organism proteins are adsorbed on material surface and next the platelets undergo adhesion. Only small reduction of platelet concentration in comparison to control probe suggests the potential biocompatibility of polyurethanes. However it is necessary to carry out the investigations in dynamic conditions, which involve the rheologic parameter [12].

Już w czasie pierwszych minut od wprowadzenia ciała obcego do krwi dochodzi do adhezji białek na powierzchni materiału, a zaraz potem - do adhezji płytek krwi. Niewielki ubytek trombocytów w całej objętości badanych próbek krwi pozwala przypuszczać, że poliuretany mogą być biokompatybilne. Niezbędne są jednakże dalsze, wnikliwsze badania w tym zakresie, przeprowadzone zwłaszcza w warunkach dynamicznych, uwzględniających wpływ czynnika reologicznego [12].

Czas częściowej trombolastyny po aktywacji (czas kaolinowo-kefalinowy) (APTT) oznaczany jest dla oszacowania wewnętrznego, typowego szlaku koagulacji. APTT oznacza ilość sekund niezbędnych do powstania włókien fibryny w plazmie, po działaniu na nią czynnika częściowej trombolastyny (aktywny) i CaCl_2 [18].

Na RYSUNKACH 7 i 8 przedstawiono wpływ poliuretanów na czas częściowej trombolastyny po aktywacji (APTT) oraz na stężenie fibrynogenu po 15 minutach i 4 godzinach inkubacji krwi w 37°C . Żaden z badanych polimerów w sposób istotny nie zmienił krzepliwości krwi po 15 minutach inkubacji. Wartości zarówno APTT, jak i FIB zbliżone były do wartości próby kontrolnej. Obecność poliuretanów PUR-B i PUR-E nie wpłynęła na czas koagulacji krwi oraz stężenie fibrynogenu również po 4 godzinach inkubacji.

Nieznaczne zmiany wywołane obecnością pozostałych poliuretanów w stężeniu fibrynogenu oraz w czasie częściowej trombolastyny po aktywacji sugerują, że otrzymane poliuretany z syntetycznym poli([R,S]-3-hydroksymaślanem) mogą być atrombogeniczne. Wskazane są jednak dalsze badania, zwłaszcza nad wpływem PUR-A na wydłużenie czasu koagulacji krwi.

Kolejnym etapem po badaniach statycznych *in vitro*, przy oznaczaniu hemokompatybilności, będą testy *ex vivo* i *in vivo*, które pozwolą zweryfikować wpływ warunków (kontakt z powierzchnią próbki, warunki inkubacji) prowadzenia doświadczenia, mogących indukować zmiany parametrów krwi.

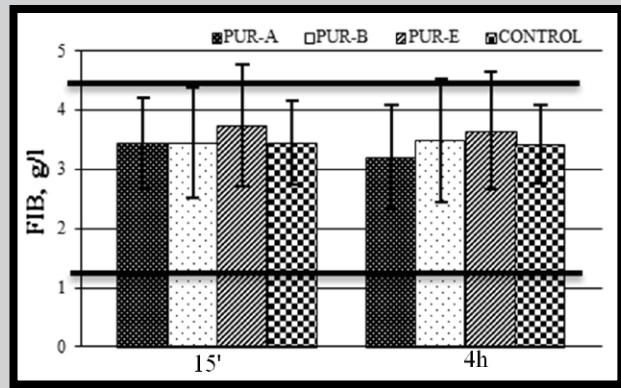
Wnioski

W pracy badano nowe poliuretany z syntetycznym poli([R,S]-3-hydroksymaślanem) w aspekcie zastosowań medycznych.

Sorpcja oleju przez próbki poliuretanów otrzymane z udziałem PTMG i a-PHB jest znacznie większa niż w przypadku poliuretanów z PCL i a-PHB w segmencie giętkim. Poliuretany z dużą ilością segmentów sztywnych absorbują mało oleju roślinnego. Masa suchej pozostałości i pH roztworów wodnych wskazują na hydrolizę wiązań estrowych a-PHB i PCL. Obserwacje widma FTIR suchej pozostałości i jej masa po ekstrakcji heksanem wskazują na podatność poliuretanu PUR-A (z PTMG i a-PHB) na działanie heksanu.

Wartości parametrów hematologicznych zarówno próbek kontrolnych, jak i po kontakcie z poliuretanami, mieszczą się w zakresach wartości referencyjnych i są porównywalne dla wszystkich badanych próbek, co wskazuje na brak hemolizy wywołanej obecnością materiału polimerowego. Nieznaczne zmiany wywołane obecnością pozostałych poliuretanów w stężeniu fibrynogenu oraz w czasie częściowej trombolastyny po aktywacji sugerują, że otrzymane poliuretany z syntetycznym poli([R,S]-3-hydroksymaślanem) mogą być atrombogeniczne.

Wyniki badań oddziaływania otrzymanych poliuretanów na parametry krwi wskazują na celowość dalszych badań w kierunku oznaczenia ich potencjalnej hemokompatybilności.



RYS. 8. Wpływ poliuretanów na stężenie fibrynogenu (FIB).
FIG. 8. Influence of PURs sample on FIB concentration.

Activated Partial Thromboplastin Time (APPT) is measured for inert coagulation path estimation and means the minutes quantity necessary for fibrin formation in plasma (after actin and CaCl_2 treatment) [18].

APPT and fibrinogen (FIB) concentration after incubation with polyurethanes are presented in FIGS 7 and 8.

After 15 minutes of incubation in blood there was no influence on blood coagulation. Values of APPT and FIB concentration are similar to control probe in all cases. PUR-B and PUR-E did not influence on investigated parameters even after 4 hours of incubation.

Insignificant changes in fibrinogen concentration and in APPT during incubation with direct contact with polymers samples suggest that obtained polyurethanes based on synthetic poly([R,S]-3-hydroxybutyrate) could be atrombogenic. In the case of PUR-A influence on the time extension of blood coagulation ought to be investigated in details.

The next stage of hemocompatibility investigations should be *ex vivo* and *in vivo* tests which could help to verify influence of conditions, like contact with tube surface or parameters of incubation.

Conclusion

The preliminary investigation of biocompatibility of polyurethanes based on synthetic atactic poly([R,S]-3-hydroxybutyrate) were done.

It was stated that the oil sorption by polyurethane samples based on PTMG and a-PHB is much higher than for PURs with PCL and a-PHB in soft segments. Polyurethane with high content of hard segments absorbed low amount of vegetable oil. Solid residues and pH of water extract indicate on hydrolysis of a-PHB and PCL ester bonds of soft segments. In the case of PUR-A (based on a-PHB and PTMG) amount of the solid residue and its FTIR spectra indicate on susceptibility of that polyurethane to hexane.

For all polyurethanes values of hematologic parameters before and after incubation of polyurethanes samples in blood are in reference ranges. Differences in comparison to control probe are not observed what suggests the lack of hemolysis activated by polyurethane presence. Insignificant changes in platelet and fibrinogen concentration and in APPT during direct contact of blood with polymers samples suggest that polyurethanes based on synthetic poly([R,S]-3-hydroxybutyrate) could be atrombogenic.

The results of influence of polyurethanes on blood parameters obtained for whole blood indicate on purposefulness of further tests to verify their hemocompatibility.

Piśmiennictwo

- [1] Adhikari R., Gunatillake P.A., Moore T.G., Biodegradable polyurethane and polyurethane ureas, Int. Patent, (2005) No. WO 2005/089778.
- [2] Gogolewski S., Biocompatible, biodegradable polyurethane materials with controlled hydrophobic to hydrophilic ratio, Pat. Int. (2006) WO 2006/010278.
- [3] Marcos Fernández M. Á A., San Roman del Barrio J., Abraham G.A., Non-toxic biodegradable polyurethanes which are intended for the controlled release of pharmaceuticals and for tissue engineering, Int. Patent, (2005) No. WO 2005/111110.
- [4] Woodhouse K.A., Skarja G.A., Biodegradable polyurethanes, US Patent (2001) No. US 6,221,997.
- [5] Lligadas G., Ronda J.C., Galiá M., Cádiz V.: Poly(ether urethane) networks from renewable resources as candidate biomaterials: synthesis and characterization. *Biomacromolecules*, 8 (2007) 686.
- [6] Pan J., Li G., Chen Z., Chen X., Zhu W., Xu K.: Alternative block polyurethanes based on poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) and poly(ethylene glycol). *Biomaterials*, 30 (2009) 2975.
- [7] Foster L.J.R., Tighe B.J., Centrifugally spun polyhydroxybutyrate fibres: accelerated hydrolytic degradation studies, *Polymer Degradation and Stability*, 87 (2005) 1.
- [8] Defoirdt T., Boon N., Sorgeloos P., Verstraete W., Bossier P. Short-chain fatty acids and poly- β -hydroxyalkanoates: (new) bio-control agents for a sustainable animal production, *Biotechnology Advances*, 27 (2009) 680.
- [9] Brzeska J., Dacko P., Janeczek H., Kowalczyk M., Janik H., Rutkowska M., Wpływ syntetycznego polihydroksymaślanu na wybrane właściwości nowych, otrzymanych z jego udziałem, poliuretanów do zastosowań medycznych. cz.II. Poliuretany z cykloalifatycznym diizocyjanianem w segmencie sztywnym, *Polimery*, 1 (2011) 27.

References

- [10] Masiulianis B., Brzeska J., Tercjak A., Polyurethane elastomers from cycloaliphatic diisocyanate and polyols with participation of castor oil, *Elastomery*, 4, (2000) 3.
- [11] Farmakopea Polska, Wyd. VI, 2002.
- [12] Jurkowski P., Ocena wpływu modyfikacji biopolimeru poli(uretano-mocznikowego) z wbudowanymi bocznymi łańcuchami alifatycznymi na biogodność z krwią, (2001) Rozprawa Habilitacyjna, Akademia Medyczna w Bydgoszczy, Bydgoszcz.
- [13] Brzeska J., Dacko P., Gębarowska K., Janik H., Kaczmarczyk B., Kasperczyk J., Kowalczyk M., Rutkowska M. The structure of novel polyurethanes containing synthetic poly[(R,S)-3-hydroxybutyrate], *Journal of Applied Polymer Science*, in press.
- [14] Thomas V., Jayabalan M., The effect of virtual cross linking on the oxidative stability and lipid uptake of aliphatic poly(urethane urea), *Biomaterials* 23 (2002) 273.
- [15] Szelest-Lewandowska A., Skupień A., Masiulianis B., Syntezy i właściwości nowych poliuretanów dla medycyny, *Elastomery* 6 (2002) 3.
- [16] 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, *Polimery w Medycynie*, 1-2 (2002) 41.
- [17] Thomas V., Kumari T.V., Jayabalan M.: In vitro studies on the effect of physical cross-linking on the biological performance of aliphatic poly(urethane urea) for blood contact applications, *Biomacromolecules* 2 (2001) 588.
- [18] Kainthan R.K., Janzen J., Levin E., Devine D.V., Brooks D.E., Biocompatibility testing of branched and linear polyglycidol, *Biomacromolecules* 7 (2008) 703.