

Goodal i inni [10] wskazali, że tętniaki aorty brzusznej są wynikiem ogólnoustrojowej choroby, która dotyka całego systemu krwionośnego i jest charakteryzowana poprzez wzrost sztywności ścian naczyń. Wielu autorów, podobnie jak autorzy, obserwuje obniżenie koncentracji elastyny w ścianie tętniaka aorty brzusznej w porównaniu do ściany zdrowego naczynia [7,8,10,11]. Na podstawie przeprowadzonych badań i otrzymanych wyników, możliwe jest stwierdzenie, że w procesie rozwoju tętniaka, włókna elastynowe ulegają degradacji, która skutkuje obniżeniem wytrzymałości ściany naczynia oraz wzrostem jego sztywności.

Piśmiennictwo

- [1] Ceniga M., et al. Growth rate and associated factors in small abdominal aortic aneurysms. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 2006; 31: 231-236.
 [2] Lindholt J.S., et al. Immunoglobulin A antibodies against Chlamydia pneumoniae are associated with expansion of abdominal aortic aneurysm. *British Journal of Surgery*, 1999; 86: 634-638.
 [3] Hans SS, et al. Size and location of thrombus in intact and ruptured abdominal aortic aneurysms. *J. Vascular Surgery*, 2005; 41: 584-588.
 [4] Vorp D.A., Geest J.P.V. Biomechanical determinants of abdominal Aortic aneurysm rupture. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2005; 25: 1558-1566.
 [5] Martino E.S.D., et al. Biomechanical properties of ruptured versus electively repaired abdominal aortic aneurysm wall tissue. *Journal of Vascular Surgery*, 2006; 43: 570-576.
 [6] Choke E., et al. Review of biological factors implicated in Abdominal aortic aneurysm rupture. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, 2005; 30: 227-244.

walls of vessels. Many authors, similarly like in presented study, have noted a loss of elastin in the wall of abdominal aortic aneurysm in comparison with the wall of a healthy abdominal aorta [7,8,10,11]. On the basis of the obtained results, it can be stated that in the process of aneurysm development elastin fibres undergo degradation, which results in a decrease of mechanical strength of a vessel and an increase of stiffness of the aortic wall.

References

- [7] Raghavan M., Webster M., Vorp D. Ex vivo biomechanical behaviour of abdominal aortic aneurysm: assessment using a new mathematical model. *Annals of Biomedical Engineering*, 1996; 24: 573-582.
 [8] He C.M., Roach M.R. The composition and mechanical properties of abdominal aortic aneurysms. *Journal of Vascular Surgery*, 1994; 20: 6-13.
 [9] Thubrikar M.J., et al. Mechanical properties of abdominal aortic aneurysm wall. *Journal of Medical Engineering & Technology*, 2001; 25: 133-142.
 [10] Goodall S., et al. The association between venous structural alterations and biomechanical weakness in patients with abdominal aortic aneurysm. *Journal of Vascular Surgery*, 2002; 35: 937-942.
 [11] Vorp D.A., Raghavan M.L., Webster M.W. Mechanical wall stress in abdominal aortic aneurysm: influence of diameter. *Journal of Vascular Surgery*, 1998; 27: 632-639.

BADANIE BIOZGODNOŚCI KOMÓRKOWEJ IN VITRO NANOSTRUKTURALNYCH ELASTOMERÓW TERMOPLASTYCZNYCH DLA IMPLANTÓW TKANKI MIĘKKIEJ

M. EL FRAY*, M. PIĄTEK

POLITECHNIKA SZCZECIŃSKA, INSTYTUT POLIMERÓW, ZAKŁAD BIOMATERIAŁÓW I TECHNOLOGII MIKROBIOLOGICZNYCH, UL. PUŁASKIEGO 10, 70-322 SZCZECIN, POLSKA

* E-MAIL: MIRFRAY@PS.PL

Streszczenie

Obiektem badań były nanostrukturalne elastomery termoplastyczne typu (A-B)_n zawierające segmenty giętkie pochodzące od dimeru kwasu linoleinowego (DLA) i segmenty sztywne zawierające poli(tereftalan butylenu) (PBT). Te nowe biomateriały proponowane są jako alternatywa dla elastomeru silikonowego w zastosowaniach na implanty piersi. Struktura, a tym samym właściwości kopolimerów zostały poddane modyfikacji wiązką szybkich elektronów. Stwierdzono, że kopolimer poddany działaniu dawki 100kGy wykazał lepszą proliferację komórek w porównaniu do materiału niemodyfikowanego i elastomeru silikonowego użytego jako materiał odniesienia. Promieniowanie jonizujące wpłynęło również pozytywnie na właściwości mechaniczne zwiększając o 100% wartość modułu Young'a w porównaniu do elastomeru silikonowego o jakości medycznej.

Słowa kluczowe: Elastomery termoplastyczne, biozgodność komórkowa in vitro, promieniowanie jonizujące [Inżynieria Biomateriałów, 81-84, (2008), 100-103]

IN VITRO CELL BIOCOMPATIBILITY OF NANOSTRUCTURED THERMOPLASTIC ELASTOMERS FOR SOFT TISSUE IMPLANTS

M. EL FRAY*, M. PIĄTEK

SZCZECIN UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, POLYMER INSTITUTE, DIVISION OF BIOMATERIALS AND MICROBIOLOGICAL TECHNOLOGIES, 10 PUŁASKIEGO STR., 70-322 SZCZECIN, POLAND

* E-MAIL: MIRFRAY@PS.PL

Abstract

Nanostructured multiblock thermoplastic elastomers of the (A-B)_n type with aliphatic segments from dimer of linoleic acid (DLA) and aromatic segments of poly(butylene terephthalate) (PBT) were investigated in this work. These new materials are proposed as an alternative to silicone elastomer for breast implants. Their structure, and thus properties were modified with e-beam radiation. It was found that polymer exposed to 100 kGy showed better cell proliferation as compared to unmodified material and to silicone elastomer used as reference material. E-beam radiation enhanced also mechanical properties by over 100% increase of Young's modulus as compared to medical grade silicone elastomer.

Keywords: Thermoplastic elastomers, in vitro cell biocompatibility, e-beam radiation.

[Engineering of Biomaterials, 81-84, (2008), 100-103]

Wstęp

W ostatnich latach obserwuje się wzrost zainteresowania implantowanymi biomateriałami o polepszonych właściwościach mechanicznych i biologicznych. Materiały dotychczas stosowane jako implanty piersi nie zawsze spełniały wymagania „idealnego” implantu z powodu kurczenia się implantów lub rozerwania polimerowej powłoki [1,2]. Dlatego wciąż poszukuje się nowych polimerów o lepszych właściwościach pod względem zachowania się w żywym organizmie i ich biofunkcjonalności.

W prezentowanej pracy zbadano nowe materiały modyfikowane promieniowaniem jonizującym. Poli(alifatyczno/aromatyczne-estry) (PED) są nanostrukturalnymi elastomerami termoplastycznymi wykazującymi biogodność *in vitro* i *in vivo* [3-5], i oczekuje się, że modyfikacja promieniowaniem jonizującym poprawi ich właściwości mechaniczne. Kopolimery PED zbudowane są z segmentów sztywnych takich jak w poli(tereftalanie butylenu) PBT, natomiast segmenty giętkie zbudowane są z estrów utworzonych przez 1,4-butanediol (1,4-BD) i dimeryzowany kwas lioleinowy (DLA). Przy małym udziale segmentów sztywnych (do 40% wag.) są one miękkie i przezroczyste.

Kopolimery modyfikowano wiązką szybkich elektronów o różnej dawce, odpowiednio 25, 50, 75 i 100kGy. Zbadano ich właściwości fizyko-chemiczne i mechaniczne oraz oceniono biogodność komórkową.

Materiały i metody

Synteza poli(alifatyczno/aromatycznych-estrów) (PED) odbywała się w reakcji transestryfikacji i polikondensacji w stopie, którą opisano we wcześniejszych publikacjach [6,7]. Badaniom poddano kopolimer zawierający 70% wag. segmentów giętkich i 30% wag. segmentów sztywnych.

Próbki były napromieniane w temperaturze otoczenia strumieniem wysokoenergetycznych elektronów generowanych w liniowym akceleratorze elektronów Elektronika 10/10 do wskazanych dawek (25, 50, 75 i 100kGy).

Frakcję żelową usieciowanych kopolimerów oznaczono metodą ekstrakcyjną. Próbki kopolimerów w postaci rozdrobnionych folii (0,1-0,2 g) umieszczono w tyglach Schotta typu P2 i poddano ekstrakcji we wrzącym tetrahydrofuranie (100cm³) pod chłodnicą zwrotną w ciągu 3 godzin. Po ekstrakcji próbki suszono w suszarce próżniowej w 60°C w ciągu 3 godzin. Dla każdej dawki wykonano 3 oznaczenia. Zawartość frakcji żelowych obliczono ze wzoru (1) jako wartość średnią z trzech pomiarów:

$$X = m_1/m_0 \cdot 100\% \quad (1)$$

gdzie: m_1 – masa wysuszonej próbki po ekstrakcji

m_0 – masa próbki przed ekstrakcją

Różnicowa kalorymetria skaningowa (DSC) wykonana została na aparacie TA Instruments (DSC Q100). Próbki były suszone pod próżnią w 60°C i trzymane w desykatytorze. Proces był prowadzony w trzech cyklach: pierwsze grzanie, następnie chłodzenie, i drugie grzanie w zakresie temperatur od – 100°C do temperatury 50°C powyżej temperatury topnienia dla każdego materiału. Proces grzania i chłodzenia prowadzony był z szybkością 10°C min⁻¹.

Badania wytrzymałościowe wykonywano w temperaturze pokojowej przy użyciu maszyny wytrzymałościowej Instron TM-M z głowicą 500N i szybkością przesuwu szczepek 100mm/min. Początkowy rozstaw szczepek wynosił 25mm. Wynik uśredniono z 6 wioselek o przekroju 0,5x4mm.

Masę cząsteczkową (M_n , M_w) i stopień polidispersyjności (M_w/M_n) kopolimerów wyznaczono metodą GPC SEC firmy Waters wykorzystując system sześciu kolumn Styragel-HR columns (106, 105, 104, 103, 500, and 100_AA), termosta-

Introduction

Over the recent years, an increasing interest on implantable biomaterials with improved mechanical and biological properties is observed. Materials used for breast implants nowadays do not always fulfill all the requirements of “ideal” implant, since capsule contracture and implant shell rupture are major problems [1,2]. Therefore, many efforts are continuously made to produce better materials in term of enhanced performance and biofunctionality.

In this work, new materials modified with e-beam radiation are investigated. Poly(aliphatic/aromatic-ester)s (PED) are nanostructured thermoplastic elastomers which showed biocompatibility *in vitro* and *in vivo* [3-5], and it is expected that after ionizing radiation, their mechanical properties will be improved. PEDs are composed of hard segments as in poly(butylene terephthalate) PBT and soft segments derived from 1,4-butanediol (1,4-BD) and unsaturated dimer of linoleic acid (DLA). At very low concentration of hard segments (up to 40wt%), very soft and transparent materials are produced.

Materials were modified with different radiation doses of ionizing energy, namely 25, 50, 75 and 100kGy. Their physico-chemical and mechanical properties were evaluated and *in vitro* cell biocompatibility was investigated in this work.

Experimental and methods

The synthesis method of poly(aliphatic/aromatic-ester) (PED) copolymer, involving transesterification and polycondensation from the melt, was described in previous publications [6,7]. The PED copolymer containing 70wt% soft segments and 30 wt% hard segments was used for the experiments.

Samples of copolymers were irradiated at ambient temperature with a high energy electron beam generated in a linear electron accelerator Elektronika 10/10 to indicated doses.

Gel fraction was calculated from the extraction method. Small pieces of polymer foils (0.1-0.2g) were placed in Schott's crucibles P2 type and extracted from boiling THF (100cm³) during 3h. Samples were then dried and weighted in order to calculate the gel fraction as in formula (1):

$$X = m_1/m_0 \cdot 100\% \quad (1)$$

where: m_1 – mass of dried sample after extraction

m_0 – mass of sample before extraction

Differential scanning calorimetry (DSC) scans were performed with a TA Instruments (DSC Q100) apparatus. The samples were dried in vacuum at 60°C, and then kept in a desiccator. The process was carried out in a triple cycle: first heating, then cooling, and second heating in the temperature range from –100°C to 50°C higher than melting point of each copolymer. The rate of heating and cooling was 10°C min⁻¹.

The quasi-static tensile data were collected at room temperature with an Instron TM-M tensile tester equipped with a 500N load cell employing a crosshead speed of 100 mm/min. The starting clamp distance was 25mm. The obtained results were averaged from 6 specimens with cross section of 0.5x4mm.

The molecular weight (M_n , M_w) and molecular weight distribution (M_w/M_n) of the block copolymers were determined by size exclusion chromatography (SEC) using a Waters system equipped with six Styragel-HR columns (106, 105, 104, 103, 500, and 100_AA pore sizes), thermostated at 35°C, a Waters 410 DRI detector thermostated at 40°C, a Dawn DSP 18 angle laser light scattering detector (MALLS)

towanych w 35°C, detector Waters 410 DRI termostatowany w 40°C, system 18 detektorów rozpraszających światło (MALLS) (Wyatt Technology), Waters 996 detektor UV. Próbkę polimerów rozpuszczono w THF.

Badania cytokompatybilności in vitro wykonano zgodnie z ISO 10 993-5. Wycięto okrągłe krążki z błon polimerowych o średnicy 15 mm, sterylizowano tlenkiem etylenu (EtO) i umieszczano w 24 dołkowych płytkach (Greiner). Fibroblasty mysie L-929 (DSMZ, Braunschweig) wysiewano w ilości 1.0×10^5 komórek/ml na 24 godziny, w środowisku 90% RPMI 1640 (GIBCO) uzupełnionym 10% serum surowicy bydłowej (GIBCO) i 1% Penstrep (GIBCO). Komórki były hodowane w 37°C w nawilżanej atmosferze (RH=95%) i 5% CO₂. Zastosowano test WST-1 do oszacowania aktywności mitochondrialnej komórek. Komórki były enzymatycznie odklejane przez trypsynizację (0.25% trypsyna in EDTA, Sigma) i zliczane przez zliczanie komórek (Beckman, Coulter Z2). Wykonano cztery pomiary dla każdego materiału. Wyniki testu porównano z wartościami polistyrenu jako kontroli. Wykonano analizę wariancyjną (test ANOVA) i przyjęto poziom istotności przy 0.001 > p.

Wyniki i dyskusja

Zsyntezowane polimery PED oraz próbki poddane modyfikacji scharakteryzowano za pomocą granicznej liczby lepkościowej i oznaczeń mas cząsteczkowych, a wyniki przedstawiono w TABELI 1. Jak wynika z TABELI 1, wzrost dawki promieniowania prowadzi do wzrostu zarówno lepkości jak i mas cząsteczkowych polimerów. Wiadomo, że promieniowanie jonizujące jest jedną z metod sieciowania polimerów, dlatego oznaczono również zawartość frakcji żelowej. Wyniki przedstawione w TABELI 1 wskazują, że ekspozycja materiału na dawkę 100kGy znacząco wpływa na zawartość frakcji żelowej, która wynosi ponad 50%. Tłumaczy to zatem obserwowany wzrost lepkości i mas cząsteczkowych z rosnącą dawką promieniowania. Podobne obserwacje nasuwają się podczas analizy wyników badań mechanicznych: materiał poddany dawce 100 kGy wykazuje wzrost wartości naprężenia przy zerwaniu i ponad dwukrotnie wyższą wartość modułu Younga w porównaniu do elastomeru silikonowego (TABELA 1). Wyniki badań mechanicznych mogą zatem sugerować, że tak zmodyfikowany materiał jest znacznie lepszy pod względem wartości E_{mod} w porównaniu do materiałów stosowanych obecnie na implanty piersi.

Za tworzeniem się dwojakiem rodzaju wiązań: fizycznych (natywnych) i chemicznych (po napromienianiu) przemawiają również wyniki analizy termicznej (DSC). Kopolimery PED są elastomerami termoplastycznymi wykazującymi niskotemperaturową przemianę zeszklenia (T_g) oraz wysokotemperaturowe topnienie (T_m), jak to pokazano na RYS. 1. Ta natywna „fizycznie usieciowana” struktura polimeru ulega modyfikacji po dawce promieniowania jonizującego na co wskazuje mocne obniżenie w kierunku niższych temperatur wartości T_g po dawce 100kGy. Jest to wyraźna oznaka utworzenia się dodatkowej sieci wiązań chemicznych w obszarach amorficznych segmentów giętkich.

TABELA 1. Skład i wybrane właściwości kopolimerów PED. X–frakcja żelowa, $[\eta]$ –graniczna liczba lepkościowa, M_n , M_w –liczbowo i wagowo średni ciężar cząsteczkowy, M_w/M_n –stopień polidispersyjności, σ_r –naprężenie zrywające, ϵ_r –wydłużenie przy zerwaniu, E_{mod} – moduł Younga.

TABLE 1. Composition and selected properties of PED copolymers.

X–gel graction, $[\eta]$ – limiting viscosity number, M_n , M_w –molecular weight, M_w/M_n –molecular weight distribution, σ_r –tensile stress, ϵ_r –elongation at break, E_{mod} –Young's modulus.

Lp.	Materiał	Dawka [kGy]	X [%]	$[\eta]$ [dl/g]	M_n [g/mol]	M_w [g/mol]	M_w/M_n n	σ_r [MPa]	ϵ_r [%]	E_{mod} [MPa]
1	PBT/DLA			0,998	5556	12610	2,27	8,48	1181	5,10
2	PBT/DLA	25		1,001	47940	77050	1,60	8,54	1183	4,54
3	PBT/DLA	50	29,6	1,059	22110	48590	2,20	8,77	1234	4,08
4	PBT/DLA	75		1,133	32780	69290	2,11	8,86	1237	4,11
5	PBT/DLA	100	51,4	1,307	102800	182200	1,80	9,61	1223	5,69
6	SILICONE							12,3	1005	2,53

(Wyatt Technology), and a Waters 996 UV detector. The mobile phase for the SEC was THF at 1 ml/min, continuously distilled off CaH₂ and recirculated.

The in vitro cytocompatibility investigations were carried out according to ISO 10 993-5. Polymer films were stamped into round disks of 15mm diameter, sterilized by the ethylene oxide (EtO) and placed in 24-well plates (Greiner) serving as positive control. L-929 mouse fibroblasts (DSMZ, Braunschweig) were seeded at 1.0×10^5 cells/ml for the 24 hour test in 90% RPMI 1640 medium (GIBCO) supplemented with 10% fetal bovine serum (GIBCO) and 1% Penstrep (GIBCO). Cells were cultured at 37°C in a humidified atmosphere (RH=95%) and 5% CO₂. The WST-1 test assay was used to estimate the mitochondrial activity of the cells. The cells were enzymatically detached by trypsinization (0.25% trypsin in EDTA, Sigma) and counted with a cell counter (Beckman, Coulter Z2). Four measurements on each material were performed. The test results were evaluated as percentage of the values received with polystyrene. Analysis of variance (one-way ANOVA) was performed and differences considered highly significant at 0.001 > p.

Results and discussion

The synthesized PED materials were characterized by limiting viscosity number and gel permeation chromatography and results are summarized in TABLE 1. It can be noticed that increasing radiation dose increases polymer viscosity and molecular mass. Since e-beam radiation can induce cross-linking, the cross-links density was also determined. As can be also seen from TABLE 1, radiation dose of 100kGy increases significantly crosslinks density up to 51,4%. This explains significant increase of limiting viscosity number and molecular weight of this material. The same observation was made when results of mechanical testing were analyzed: material exposed to 100kGy e-beam radiation showed increased tensile strength and more importantly, over two fold increase of Young's modulus as compared to silicone elastomer (TABLE 1). Resulted mechanical properties are higher in E_{mod} values as compared to material used nowadays for breast implants.

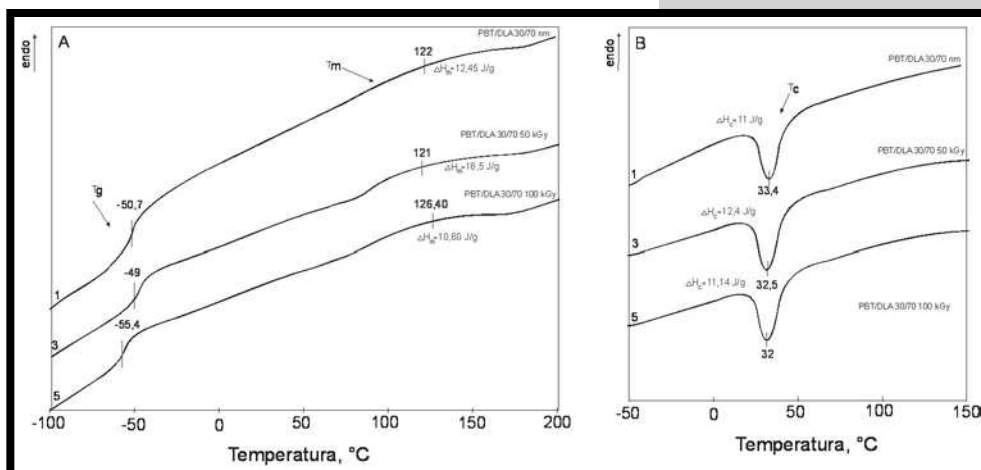
Formation of a double physical (native) and chemical network (after modification) and manifested by changes of physical and mechanical properties, was also investigated by differential scanning calorimetry (DSC). PED materials are thermoplastic elastomers showing low temperature glass transition (T_g) and high temperature melting (T_m) as can be seen from FIGURE 1. This „physically crosslinked” polymer structure is modified after exposure to e-beam as demonstrated by significant shift of T_g toward lower temperature after 100KGy dose. This clearly indicates that additional chemical network within soft amorphous phase is formed.

The results of cell cytotoxicity of PED material after exposure to 100kGy is presented in FIGURE 2. Investigated material showed higher values of cell proliferation as compared to unmodified PED material and to silicone elastomer. This observation again confirms that e-beam radiation

is enhancing PED material properties thus making it as very promising candidate for soft tissue implants.

Conclusions

Nanostructured PED thermoplastic elastomers were synthesized and subjected to e-beam radiation. The results of physical and thermal characterization revealed formation of a double physical and chemical network structure providing enhanced mechanical properties. The ionizing radiation enhances also cell proliferation, thus making the PED material exposed to 100kGy radiation dose a very promising candidate to soft tissue implants (e.g. as material for breast implants).



RYS. 1. Krzywe DSC grzania (A) i chłodzenia (B) kopolimerów PED modyfikowanych promieniowaniem jonizującym. Numery krzywych odpowiadają numerom próbek w TABELI 1.

FIG. 1. DSC curves of PED copolymers during heating (A) and cooling (B) modified with e-beam radiation. Numbers of curves correspond to the numbers of samples in TABLE 1.

Wyniki biologiczności komórkowej polimerów PED po dawce 100kGy przedstawiono na RYS.2. Badany materiał wykazał wyższy procent proliferacji komórek w porównaniu do materiału niemodyfikowanego i elastomeru silikonowego o jakości medycznej wskazując na duży potencjał stosowania tego materiału jako implant tkanek miękkich.

Wnioski

Nanostrukturalne elastomery termoplastyczne (TPE) zostały zsyntezowane i poddane napromienianiu dawką szybkich elektronów. Wyniki badań fizycznych i termicznych wskazują na utworzenie się podwójnej sieci wiązań fizycznych i chemicznych wpływającej na polepszenie właściwości mechanicznych. Modyfikacja szybkimi elektronami wpływa również na proliferację komórek, stąd też polimer poddany modyfikacji dawką 100kGy jest bardzo obiecującym materiałem na implanty tkanek miękkich (np. na implanty piersi).

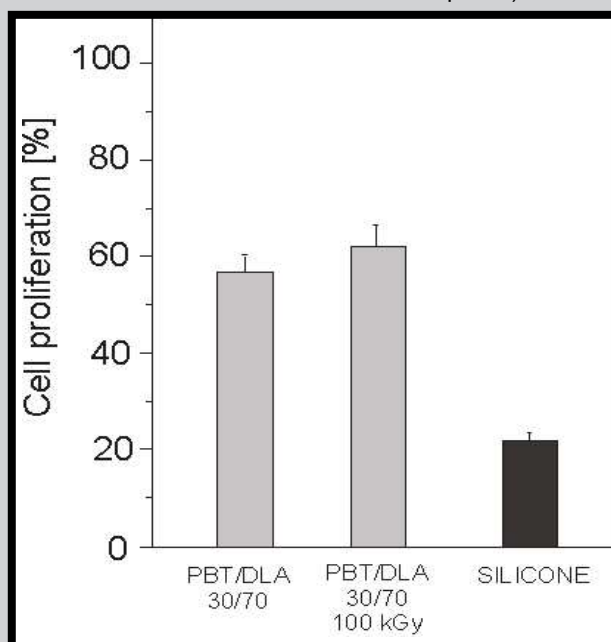
Podziękowania

Prace były finansowane w ramach projektu DWM/18/POL/2005.

Piśmiennictwo

- [1] E.G. Wilkins EG, et al, Journal of the American Cancer Society 1995; 180(2), 177.
- [2] S.E. Ong, S. Zhang, H. Du, H.C. Too, K.N. Aung. Biomaterials 2007; 28, 4033.
- [3] M. El Fray, A. Bartkowiak, P. Prowans, J. Slonecki. J. Mater. Sci. Mater. Med., 2000, 11, 757.
- [4] P. Prowans, M. El Fray, J. Slonecki, Biomaterials, 2002, 23, 2973.
- [5] M. Renke-Gluszko, M. El Fray, Biomaterials, 2004, 25, 5191.
- [6] M. El Fray, J. Slonecki. Angew. Mikromol. Chemie, 1996, 234, 103.
- [7] M. El Fray, M. Piątek, G. Przybytniak. Elastomery, 2007, 11, 20.

References



RYS. 2. Proliferacja komórek (fibroblasty L-929, 24h) na powierzchni niemodyfikowanego kopolimeru PED, modyfikowanego promieniowaniem jonizującym (100kGy) oraz elastomeru silikonowego o jakości medycznej.

FIG. 2. Cell proliferation (L-929 fibroblasts, 24h) on the neat PED copolymer, modified with e-beam radiation (100kGy) and medical grade silicone.

Acknowledgements

This work has been financed from the research project DWM/18/POL/2005.