

RADIACYJNA STERYLIZACJA POLI(ϵ -KAPROLAKTONU) (II)

KATARZYNA FILIPCZAK*, MAGDALENA WOŹNIAK*,
PIOTR ULAŃSKI*, JANUSZ M. ROSIAK*, GRAŻYNA PRZYBYTNIK**,
RADOSŁAW M. OLKOWSKI***, MAŁGORZATA LEWANDOWSKA-
SZUMIEŁ***

*MIĘDZYRESORTOWY INSTYTUT TECHNIKI RADIACYJNEJ,
POLITECHNIKA ŁÓDZKA,

UL. WRÓBLEWSKIEGO 15, 93-590 ŁÓDŹ

**INSTYTUT CHEMII I TECHNIKI JĄDROWEJ,

UL. DORODNA 16, 03-195 WARSZAWA

***ZAKŁAD BIOFIZYKI I FIZJOLOGII CZŁOWIEKA,

AKADEMIA MEDYCZNA W WARSZAWIE,

UL. CHAŁUBIŃSKIEGO 5, 02-004 WARSZAWA

[Inżynieria Biomateriałów, 47-53,(2005),113-115]

Wstęp

W procesie wytwarzania porowatych struktur z poli(ϵ -kaprolaktonu) - PCL - przeznaczonych do zastosowań biomedycznych, rozważa się wykorzystanie sterylizacji radiacyjnej. Napromienianie PCL powoduje opisane w poprzednim artykule zmiany struktury cząsteczkowej polimeru wskutek reakcji wolnych rodników generowanych pod wpływem promieniowania. Jeśli napromienimy w celu sterylizacji materiał zawierający stały PCL, można oczekiwać, że nie wszystkie wygenerowane rodniki zanikną bezpośrednio po napromienieniu. Część z nich może być pułapowana w obszarach krystalicznych polimeru i zanikać (reagować) bardzo powoli, w czasie wielu godzin, a nawet wielu dni po napromienieniu. Wskutek tego zjawiska struktura cząsteczkowa i pewne właściwości napromienionego produktu mogą ulegać zmianom w podobnej skali czasowej (tzw. efekt następczy), a zatem właściwości materiału przechowywanego przez dłuższy czas po sterylizacji mogą się różnić od właściwości wykazywanych bezpośrednio po napromienieniu. Efekty następcze towarzyszące napromienieniu PCL nie były dotychczas opisane, mimo że analogiczne zjawiska są znane dla innych polimerów, na przykład dla polipropylenu [1,2].

Celem pracy było wykazanie istnienia efektu następczego w PCL po napromienieniu w temperaturze pokojowej, potwierdzenie, że efekt ten jest związany z istnieniem pułapowanych (długo żyjących) rodników i przeprowadzenie wstępnych testów biologicznych mających wykazać, czy efekt następczy powoduje wyraźne zmiany biogodności materiału.

Materiał i metody

Poli(ϵ -kaprolakton) (Aldrich, nominalny $M_w=80$ kDa), oczyszczano poprzez wytrącenie wodą z roztworu w acetonie. Próbkę poddawano działaniu promieniowania jonizującego z dostępem powietrza. Lepkości istotne roztworów PCL w tetrahydrofuranie oznaczano w 25,0 oC za pomocą wiskozymetru Ubbelohde'a (AVS-310, Schott Geräte). Badano żywotność ludzkich osteoblastów w kontakcie z PCL o różnym okresie przechowywania (w temperaturze pokojowej z dostępem powietrza) po napromienieniu. Komórki hodowano przez 7 dni, a ich przeżywalność badano za pomocą testu XTT. Dane dotyczące szybkości zaniku przejściowych produktów radiolizy PCL w stanie stopionym otrzymano metodą radiolizy impulsowej z detekcją spektrofotometryczną [3].

RADIATION STERILIZATION OF POLY(ϵ -CAPROLACTONE) (II)

113
.....

KATARZYNA FILIPCZAK*, MAGDALENA WOŹNIAK*,
PIOTR ULAŃSKI*, JANUSZ M. ROSIAK*, GRAŻYNA PRZYBYTNIK**,
RADOSŁAW M. OLKOWSKI***, MAŁGORZATA LEWANDOWSKA-
SZUMIEŁ***

*INSTITUTE OF APPLIED RADIATION CHEMISTRY,
TECHNICAL UNIVERSITY OF ŁÓDŹ,

WRÓBLEWSKIEGO 15, 93-590 ŁÓDŹ, POLAND

**INSTITUTE OF NUCLEAR CHEMISTRY AND TECHNOLOGY,

DORODNA 16, 03-195 WARSZAW, POLAND

*** DEPARTMENT OF BIOPHYSICS AND HUMAN PHYSIOLOGY,

MEDICAL UNIVERSITY OF WARSZAW,

CHAŁUBIŃSKIEGO 5, 02-004 WARSZAW, POLAND

[Engineering of Biomaterials, 47-53,(2005),113-115]

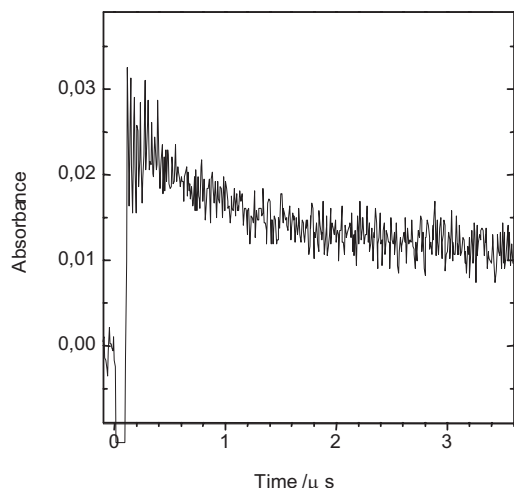
Introduction

In the manufacturing process of porous polymeric structures for biomedical applications based on poly(ϵ -caprolactone) - PCL, the use of ionizing radiation is considered for sterilization. As described in the preceding paper, irradiation of PCL causes changes in molecular structure of this polymer due to the reactions of radiation-generated free radicals. It is expected that in solid PCL not all radicals decay immediately after the irradiation is terminated. Some part of radicals may be trapped in crystalline regions of the polymer and decay (react) very slowly, in hours or even days after irradiation. Because of that, molecular structure and some properties of the product may undergo changes at a similar time scale ("post-effect"). Therefore, the properties of PCL stored for a long time after irradiation may be different from the properties observed just after radiation processing. Radiation-induced post-effect in PCL has not yet been described, despite the fact that such phenomena are known in other polymers, e.g. polypropylene [1,2].

The aim of this work was to prove the existence of radiation-induced post-effect in solid PCL, to confirm that this effect is caused, at least in part, by the existence of trapped (long-lived) polymer radicals and to conduct preliminary biological tests on the influence of post-effect on the biocompatibility of irradiated PCL.

Materials and methods

Poly(ϵ -caprolactone) (Aldrich, nominal $M_w=80$ kDa), was purified by precipitation with water from acetone solution. Samples were subjected to ionizing radiation at R.T. in the presence of air, unless stated otherwise. Intrinsic viscosities of PCL in tetrahydrofuran were determined at 25.0 oC with an Ubbelohde viscometer (AVS-310, Schott Geräte). Vitality of human osteoblasts was tested in contact with PCL stored (at R.T. in the presence of air) for various periods of time after irradiation. The cells were cultured for 7 days and the vitality was determined by XTT test. Data on the decay of transient products formed by the radiolysis of molten PCL were obtained by pulse radiolysis with spectrophotometric detection [3].



RYS. 1. Kinetyka zaniku przejściowych produktów radiolizy PCL po impulsowym napromienieniu dawką 50 Gy odtlenionego, stopionego polimeru w temperaturze 60°C. Absorbancja przy $\lambda=295$ nm w funkcji czasu.

FIG. 1. Decay kinetics of transient reactive species after pulse-irradiation of deoxygenated, molten PCL at 60°C with a dose of 50 Gy. Absorbance at $\lambda=295$ nm as a function of time after pulse.

Wyniki

Jeśli PCL jest napromieniony w stanie stopionym, reakcje produktów przejściowych radiolizy są szybkie (czas połowkowy ich zaniku jest rzędu kilku mikrosekund, RYS.1), i po krótkim czasie układ osiąga stabilny stan końcowy.

Jeśli jednak PCL jest napromieniony w stanie stałym, zanik wolnych rodników jest bardzo powolny i obserwuje się zmiany właściwości materiału przechowywanego przez dłuższy czas po sterylizacji.

RYS.2 ilustruje zmiany lepkości istotnej roztworów PCL w tetrahydrofuranie, w funkcji czasu przechowywania próbek po napromienieniu. Próbki były napromieniane i przechowywane z dostępem powietrza w stanie stałym w temperaturze pokojowej, a roztwory do pomiarów wiskozymetrycznych były wykonywane bezpośrednio przez wykonaniem analizy. Lepkość istotna jest funkcją średniego ciężaru cząsteczkowego.

Na RYS.3 przedstawiono wyniki badań żywotności osteoblastów w kontakcie z PCL, dla próbek przechowywanych przez różny czas po napromienieniu.

Dyskusja

Ciężar cząsteczkowy PCL po napromienieniu ulega istotnym zmianom w ciągu 14 dni od napromienienia - początkowo obserwuje się wzrost, a następnie spadek wartości tego parametru, co może wskazywać na początkową dominację reakcji sieciowania, a następnie degradacji (należy zaznaczyć, że przy przechowywaniu stałego, nie napromienionego PCL przez 14 dni nie obserwuje się zmian lepkości roztworów). Wstępne pomiary wykonane metodą EPR wykazały, że istotnie po napromienieniu w temperaturze pokojowej w PCL obserwuje się wolne rodniki. Po 2 godzinach od napromienienia dawką 28 kGy ich stężenie zmniejsza się o około 20%. Otrzymane wyniki wskazują, że można istotnie wiązać występowanie efektu następczego w PCL

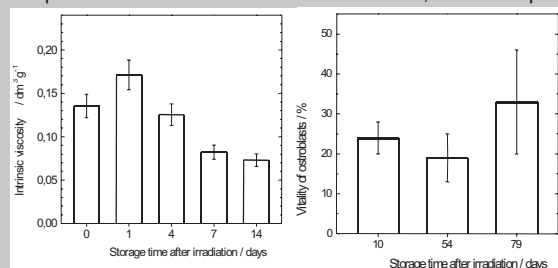
Results

If PCL is irradiated in the molten state, reactions of the transient radiolysis products are very fast (their half-life is in the order of a few microseconds, FIG.1) and after a short time the system attains the final, stable state.

If, however, the same polymer is irradiated in the solid state, the decay of some of the radicals is very slow, and properties of PCL change in the course of time after sterilization. FIG.2 illustrates the changes in intrinsic viscosity of PCL solutions in tetrahydrofuran, as a function of sample storage time after irradiation. The samples were irradiated and stored in the solid state at R.T. in the presence of air, and the solutions were prepared directly before analysis. Intrinsic viscosity is a function of the average molecular weight. Results of osteoblast vitality tests in contact with PCL stored for various period of time after irradiation are presented in FIG.3.

Discussion

The average molecular weight of PCL undergoes significant changes within 14 days after irradiation. Initially an increase and subsequently a decrease in molecular weight is observed. This is probably due to the initial domination of cross-linking reactions and, at a longer time-scale, to the prevalence of chain scission processes (it should be noted that in solid, non-irradiated PCL no significant change in solution viscosity is observed within 14 days of storage). Preliminary EPR measurements indicate that in fact radicals can be observed in solid PCL after irradiation at R.T. Their concentration is reduced by ca. 20% in 2 hours after irradiation by a dose of 28 kGy. These results indicate that the post-effect observed in irradiated PCL is, at least in part,



RYS. 2. Zależność lepkości istotnej roztworów PCL w tetrahydrofuranie w temperaturze 25,0°C od czasu przechowywania próbek polimeru po napromienieniu. Próbki napromieniano i przechowywano w stanie stałym w temperaturze pokojowej, z dostępem powietrza. Dawka 15 kGy.

FIG. 2. Intrinsic viscosity of PCL in tetrahydrofuran at 25.0°C as a function of sample storage time after irradiation (dose 15 kGy). Samples were irradiated and stored in the solid state, at R.T., in the presence of air.

RYS. 3. Żywotność osteoblastów w kontakcie z PCL o różnym czasie przechowywania po napromienieniu, oceniana za pomocą testu XTT w z g l ę d e m w z o r c o w e j p o w i e r z c h n i p o l i s t y r e n o w e j (TCPS).

FIG. 3. Vitality of osteoblasts in contact with PCL stored for various period of time after irradiation, determined by XTT test in relation to a standard polystyrene surface (TCPS).

z istnieniem stosunkowo stabilnych wolnych rodników. Na obecnym etapie badań nie można jednak wykluczyć również innych, dodatkowych mechanizmów powodujących degradację polimeru w długiej skali czasowej, na przykład poprzez rozkład ugrupowań nadtlenkowych.

Z praktycznego punktu widzenia jest bardzo istotne, czy towarzyszący sterylizacji radiacyjnej materiałów wykonanych z PCL efekt następczy wpływa w zasadniczy sposób na ich biogodność. Przeprowadziliśmy wstępne testy żywotności ludzkich osteoblastów wyizolowanych z fragmentów kości, hodowanych w kontakcie ze sterylizowanym radiacyjnie PCL, przy czym okres od sterylizacji do rozpoczęcia hodowli (trwającej zawsze 7 dni) był różny i zawierał się w przedziale od 10 do 79 dni. Otrzymane wyniki nie wykazały statystycznie istotnych różnic żywotności komórek pozostających w kontakcie z PCL o różnym czasie przechowywania po napromienieniu, a zatem nie wykazały istotnego pogorszenia się biogodności PCL wskutek efektu następczego. Jest oczywiste, że efekt następczy ma bardzo istotne znaczenie dla praktycznej możliwości stosowania sterylizacji radiacyjnej produktów z PCL i badania nad tym zjawiskiem muszą być kontynuowane.

Wnioski

Napromienianiu poli(ϵ -kapolaktanu) w stanie stałym towarzyszy wyraźny efekt następczy, przejawiający się w postępujących, przez co najmniej 14 dni po napromienieniu, zmianach ciężarów cząsteczkowych polimeru. Efekt ten jest przynajmniej częściowo spowodowany pułapkowaniem generowanych radiacyjnie rodników polimerowych w obszarach krystalicznych PCL. Wstępne badania nie wykazały istotnego pogorszenia się biogodności PCL wskutek efektu następczego. Jednak w perspektywie stosowania sterylizacji radiacyjnej do biomateriałów zawierających PCL wydaje się celowe prowadzenie dalszych badań nad tym zjawiskiem.

Podziękowania

Praca finansowana przez Ministerstwo Nauki i Informatyzacji w ramach projektu 05/PBZ-KBN-082/T08/2002.

Piśmiennictwo

[1] Gavrilu D.E., Gosse B.J.: Post-irradiation Degradation of Polypropylene, *Radioanal. Nucl. Chem.*, 185, (1994), 311-317.

related to the existence of trapped, relatively stable radicals. At the current stage of studies it is not possible, however, to exclude the presence of other mechanisms causing slow degradation of PCL after irradiation, e.g. decomposition of hydroperoxides.

From the practical point of view, it is very important to know whether the post-effect accompanying radiation sterilization of PCL-based biomaterials has a pronounced influence on their biocompatibility. We have performed preliminary tests on human osteoblasts isolated from bone fragments, cultivated in contact with radiation-sterilized PCL, while the period between sterilization and start of the culture was varied from 10 to 79 days. The obtained results do not indicate any statistically significant difference in vitality of osteoblasts in contact with PCL of various post-irradiation storage period, thus there is no indication of any detrimental influence of post-effect on the PCL biocompatibility. It is clear that the radiation-induced post-effect is of great importance for the practical possibility of applying radiation sterilization to PCL-based biomaterials and that the studies on this phenomenon should be continued.

Conclusions

Irradiation of solid poly(ϵ -caprolactone) is accompanied by a pronounced post-effect that manifests itself by changes in average molecular weight in the period of at least 14 days after radiation treatment. This effect is, at least in part, caused by trapping of radiation-generated polymer radicals in crystalline regions of PCL. Preliminary data do not indicate any negative influence of the post-effect on the biocompatibility of PCL, but there is a need for more detailed studies on this phenomenon before radiation sterilization is applied to PCL-based biomaterials.

Acknowledgements

This work was financed by the Minister of Science and Information Society Technologies, Poland (project 05/PBZ-KBN-082/T08/2002).

References

[2] Fautitano A., Buttafava A., Martinotti F., Bortolus P., Comincioli V.: ESR Study of the Molecular Dynamic of Peroxyradicals in the Post-irradiation Oxidation of Isotactic Polypropylene, *J. Polym. Sci., Part A, Polym. Chem.* 25, (1987), 1517-1521.
[3] von Sonntag C., Schuchmann H.-P.: Pulse Radiolysis, *Meth. Enzymol.* 233, (1994), 3-20.

Piśmiennictwo

[1] Gavrilu D.E., Gosse B.J.: Post-irradiation Degradation of Polypropylene, *Radioanal. Nucl. Chem.*, 185, (1994), 311-317.

[2] Fautitano A., Buttafava A., Martinotti F., Bortolus P., Comincioli V.: ESR Study of the Molecular Dynamic of Peroxyradicals in the Post-irradiation Oxidation of Isotactic Polypropylene, *J. Polym. Sci., Part A, Polym. Chem.* 25, (1987), 1517-1521.
[3] von Sonntag C., Schuchmann H.-P.: Pulse Radiolysis, *Meth. Enzymol.* 233, (1994), 3-20.