

WPLYW PROMIENIOWANIA ELEKTRONOWEGO NA BIORESORBOWALNE TERPOLIMERY ZAWIERAJĄCE PAKLITAKSEL

MONIKA MUSIAŁ-KULIK^{1*}, JANUSZ KASPERCZYK^{1,2},
KATARZYNA JELONEK¹, KATARZYNA GĘBAROWSKA¹,
HENRYK JANECZEK¹, PIOTR DOBRZYŃSKI¹

¹ CENTRUM MATERIAŁÓW POLIMEROWYCH I WĘGLOWYCH,
POLSKA AKADEMIA NAUK,
UL. M. SKŁODOWSKIEJ-CURIE 34, 41-819 ZABRZE, POLSKA

² KATEDRA I ZAKŁAD BIOFARMACJI, ŚLĄSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY,
UL. NARCYZÓW 1, 41-200 SOSNOWIEC, POLSKA

* E-MAIL: MONIKA.MUSIAL-KULIK@CMPW-PAN.EDU.PL

Streszczenie

Sterylicacja jest bardzo ważnym czynnikiem uzależniającym przydatność materiałów do zastosowań medycznych. Obiecującą metodą sterylizacji wydaje się być promieniowanie wiązką elektronową. Celem badania była analiza wpływu promieniowania elektronowego (EB) na terpolimery zawierające paklitaksel. Dwa typy materiałów użyto do przygotowania matryc zawierających 5 i 10% leku, jak również matryc bez leku: poli(L-laktyd-ko-glikolid-ko-ε-kaprolakton) (44:32:24) – P(LA:GA:Cap) oraz poli(L-laktyd-ko-glikolid-ko-węglan trimetyleny) (62:27:11) – P(LA:GA:TMC). Wszystkie otrzymane matryce badano przed i po procesie elektronowego napromieniania dawką 25kGy za pomocą spektroskopii NMR, DSC i GPC. Nie wykazano różnic w składzie komonomerów, temperaturze zeszklenia, liczbowo średniej masie cząsteczkowej jak również w rozrzucie mas cząsteczkowych (dyspersyjność) pomiędzy matrycami otrzymanymi z tego samego typu terpolimeru przed procesem sterylizacji. Promieniowanie elektronowe spowodowało spadek liczbowo średniej masy cząsteczkowej oraz temperatury zeszklenia. Zmiany w składzie komonomerów zauważono tylko w przypadku matryc z P(LA:GA:Cap), co może sugerować mniejszą odporność jednostek kaproilowych na sterylizację.

Słowa kluczowe: bioresorbowalne terpolimery, paklitaksel, promieniowanie elektronowe, sterylizacja, polimery z pamięcią kształtu

[Inżynieria Biomateriałów, 94, (2010), 24-27]

Wprowadzenie

Ze względu na anty-proliferacyjne właściwości paklitakselu, może on zmniejszać lub hamować proliferację i migrację komórek mięśni gładkich ścian naczyń krwionośnych, a także stan zapalny, które stanowią główną przyczynę restenozy w stencie [1,2]. Dlatego też dodatek paklitakselu uwzględniany jest w badaniach nad nową generacją całkowicie bioresorbowalnych stentów lub pokryw stentów. Polimerowe systemy kontrolowanego uwalniania leków muszą spełniać wiele kryteriów zanim zostaną zaimplantowane do ludzkiego organizmu. Muszą być biokompatybilne, degradować do nietoksycznych produktów, mieć odpowiednie właściwości mechaniczne i umożliwiać precyzyjne uwalnianie leku. Materiały takie powinny być też łatwe w sterylizacji.

THE INFLUENCE OF ELECTRON BEAM RADIATION ON BIORESORBABLE TERPOLYMERS CONTAINING PACLITAXEL

MONIKA MUSIAŁ-KULIK^{1*}, JANUSZ KASPERCZYK^{1,2},
KATARZYNA JELONEK¹, KATARZYNA GĘBAROWSKA¹,
HENRYK JANECZEK¹, PIOTR DOBRZYŃSKI¹

¹ CENTRE OF POLYMER AND CARBON MATERIALS,
POLISH ACADEMY OF SCIENCES,
34 SKŁODOWSKA-CURIE ST, ZABRZE 41-819, POLAND

² DEPARTMENT OF BIOPHARMACY,
MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA,
1 NARCYZOW ST, SOSNOWIEC 41-200, POLAND

* E-MAIL: MONIKA.MUSIAL-KULIK@CMPW-PAN.EDU.PL

Abstract

Sterilization is a very important factor determining usefulness of materials for medical application. The promising method of sterilization seems to be electron beam radiation. The aim of this study was to analyze the influence of the EB radiation on terpolymers containing paclitaxel. Two types of materials were used to prepare three kinds of matrices – with 5% and 10% of paclitaxel as well as drug free matrices. The selected terpolymers were: poly(L-lactide-co-glycolide-co-ε-caprolactone) (44:32:24) – P(LA:GA:Cap) and poly(L-lactide-co-glycolide-co-trimethylene carbonate) (62:27:11) – P(LA:GA:TMC). All of the obtained matrices were investigated before and after electron beam (EB) irradiation with the dose of 25 kGy with the use of ¹H NMR spectroscopy, DSC and GPC. There were no differences in comonomer molar ratio, glass transition temperature, the number average molecular weight and dispersity index between non-irradiated matrices prepared from the same terpolymer type, regardless paclitaxel content. EB radiation caused decrease of the number average molecular weight as well as the glass-transition temperature. The changes of comonomer units' ratio were noticed only in the case of P(LA:GA:Cap) matrices that may suggest lower susceptibility to sterilization of caprolyl units.

Keywords: bioresorbable terpolymers, paclitaxel, electron beam radiation, sterilization, shape memory polymers

[Engineering of Biomaterials, 94, (2010), 24-27]

Introduction

Paclitaxel is taken into account in studies on new drug-loaded totally bioresorbable coronary stents or stent coatings. It was confirmed that paclitaxel has anti-proliferative properties and thus, may reduce or inhibit vascular smooth muscle cell proliferation and migration as well as inflammatory response that constitute the predominant cause of in-stent restenosis [1,2]. Polymeric controlled drug delivery systems must fulfill many requirements before implantation into human body. They must be biocompatible, degrade to non-toxic products, have appropriate mechanical properties and enable sustained drug release. They should also be sterilizable.

Materiały medyczne mogą być sterylizowane poprzez autoklawowanie, za pomocą tlenu etylenu oraz metodami jonizacji, takimi jak promieniowanie gamma, promieniowanie jonowe, promieniowanie X czy wiązką elektronów o wysokiej energii. Sterylizacja polimerów w warunkach podwyższonej temperatury powoduje utratę ich właściwości mechanicznych, podczas gdy pozostałości tlenu etylenu są trudne do usunięcia [3,4]. Stwierdzono, że promieniowanie gamma przyspiesza degradację bioresorbowalnych polimerów, co może powodować również szybsze uwolnienie leku [5]. Z tych względów, promieniowanie wiązką elektronową wydaje się być obiecującym rozwiązaniem problemów.

Materiały i metody

L-laktyd, glikolid, węglan trimetylenu (TMC) oraz ϵ -prolaktone zostały użyte do otrzymania terpolimerów, które wykorzystano do sporządzenia matryc zawierających 5 i 10% paklitakselu oraz matryc niezawierających leku. Polimeryzację z otwarciem pierścienia była prowadzona w masie, w temperaturze 120°C w obecności $Zr(Acac)_4$, jako niskotoksycznego inicjatora [6] przy zachowaniu stosunku molowego inicjator/monomery (I/M) równego 1/1000. Terpolimery zsyntezowano Centrum Materiałów Polimerowych i Węglowych, PAN w Zabrze, natomiast czysty paklitaksel zakupiono w LC Laboratories®.

Roztwory różnych terpolimerów w chlorku metylenu mieszano z roztworem zawierającym odpowiednią ilość leku i wlewano na szklaną płytę. Po odparowaniu rozpuszczalnika w temperaturze pokojowej, suszenie uzyskanych matryc kontynuowano zmniejszonym ciśnieniem. Następnie wycięto z nich matryce o średnicy 12 mm.

Hermetycznie zamknięte próbki sterylizowano poprzez napromienianie wiązką elektronów o energii 10 MeV emitowaną przez akcelerator elektronowy. Dawka promieniowania wynosiła 25 kGy.

Skład komonomeryczny terpolimerów charakteryzowano na podstawie widm 1H zarejestrowanych na spektrometrze NMR o wysokiej rozdzielczości (on AVANCE II Ultra Shield Plus, 600 MHz, Bruker). Próbki rozpuszczano w osuszonym DMSO. Tetrametylosilan użyto jako wzorzec wewnętrzny w celu określenia przesunięć chemicznych (ppm).

Liczbowo średnie masy cząsteczkowe (M_n) oraz rozrzut mas cząsteczkowych (D) analizowano z wykorzystaniem chromatografu żelowego (Physics SP 8800), stosując chloroform jako rozpuszczalnik w oparciu o standardy polistyrenowe.

Do analizy właściwości termicznych zastosowano metodę różnicowej kalorymetrii skaningowej. Aparat (TA DSC 2010, TA Instruments, New Castle, DE) kalibrowano za pomocą indu i galu o wysokiej czystości. Matryce skanowano z szybkością ogrzewania wynoszącą 20°C/min w zakresie od -100°C do 220°C. Temperaturę zeszklenia (T_g) wyznaczano z drugiego skanu DSC (po ogrzaniu próbek do temperatury 220°C schładzano je do -100°C poprzez umieszczenie w ciekłym azocie i ponownie ogrzewano do 220°C).

Wyniki i dyskusja

Celem niniejszego badania było określenie wpływu promieniowania elektronowego na bioresorbowalne matryce zawierające paklitaksel. Matryce bez paklitakselu oraz matryce z 5 i 10% zawartością leku wykonano z dwóch rodzajów terpolimerów: poli(L-laktyd-ko-glikolid-ko- ϵ -prolaktone) (44:32:24) – P(LA:GA:Cap) oraz poli(L-laktyd-ko-glikolid-ko-węglanu trimetylenu) (62:27:11) – P(LA:GA:TMC). Dowiedziono, iż materiały tego typu wykazują efekt pamięci kształtu, który może być przydatny w opracowaniu

Medical devices can be sterilized with the use of autoclaving, ethylene oxide or ionizing methods such as gamma irradiation, ion beams, X rays or accelerated electrons. Sterilization of polymers with high temperature decreases their mechanical properties while ethylene oxide residues are difficult to remove [3,4]. It was also reported that gamma irradiation accelerates degradation of biodegradable polymers, which may also cause faster drug release [5]. Due to the drawbacks of those methods, electron beam (EB) radiation seems to be a promising solution.

Materials and methods

Terpolymers synthesized from L-lactide, glycolide, trimethylene carbonate (TMC) and ϵ -caprolactone at the Centre of Polymer and Carbon Materials, PAScs in Zabrze were used to prepare matrices with 5 or 10% of paclitaxel as well as drug free matrices. The ring-opening copolymerization was carried out in bulk at 120°C in the presence of $Zr(Acac)_4$ as a low toxic initiator [6] with the initiator to monomer molar ratio (I/M) of 1/1000. Pure paclitaxel was purchased from LC Laboratories®.

The solution of various terpolymers in methylene chloride were mixed with the solution of appropriate amount of drug and then cast on a glass plate with the special casting device. After evaporating at ambient temperature, films were dried under reduced pressure. The matrices with dimension of 12 mm were cut from the films and used for the study.

Hermetically sealed samples were irradiated with the accelerating voltage of 10 MeV produced by electron accelerator and the radiation dose of 25 kGy.

Terpolymers composition was characterized by analysis of 1H spectra recorded at 600 MHz on AVANCE II Ultra Shield Plus, Bruker. Specimens were dissolved in dried DMSO-d₆. Tetramethylsilane was used as an internal standard in order to determine chemical shifts (ppm).

The number average molecular weight and (M_n) and molecular mass dispersity (D) were studied by means of gel permeation chromatography (GPC, Physics SP 8800 chromatograph) with the use of chloroform as a solvent.

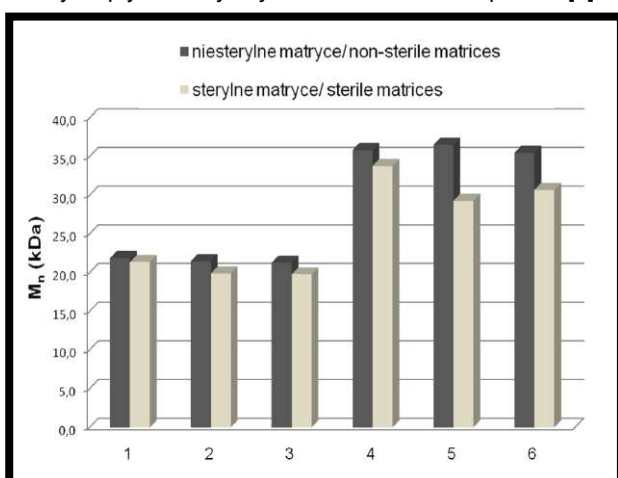
Differential scanning calorimetry (DSC) analysis was carried out with TA DSC 2010 apparatus (TA Instruments, New Castle, DE) calibrated with high purity gallium and indium. The matrices and pure paclitaxel were scanned at a heating rate of 20°C/min in the range of -100°C to 220°C. The glass-transition temperature (T_g) of matrices was obtained from the second scan (after heating to 220°C, the specimens were quenched to -100°C under nitrogen atmosphere and then heated again to 220°C).

Results and Discussions

In this study it was aimed to determine the influence of electron beam radiation on bioresorbable matrices containing paclitaxel. The drug was incorporated into two types of terpolymers: poly(L-lactide-co-glycolide-co- ϵ -caprolactone) (44:32:24) – P(LA:GA:Cap) and poly(L-lactide-co-glycolide-co-trimethylene carbonate) (62:27:11) – P(LA:GA:TMC) in order to obtain matrices with 5% and 10% (w/w) of drug. Drug free matrices were also prepared. The purpose of this study was to analyze whether sterilization influences physicochemical properties of matrices. Both terpolymers contained lactidyl and glicolidyl units, but differed in one comonomer. Thus, the effect of sterilization was compared in terpolymer with caproyl units and in terpolymer with carbonate units. It was reported that terpolymers of these types demonstrate shape-memory properties that can be useful in preparing self-expandable biodegradable drug-eluting coronary stents [7,8].

samorozprężających się, biodegradowalnych, uwalniających leki stentów naczyniowych [7,8]. Oba terpolimery zawierają jednostki laktydylowe i glikolidylowe, ale różnią się jednym ko monomerem. Określono zatem wpływ dodatku jednostek kaproilowych i węglanowych do polimeru na zwiększenie stabilności i zapobieganie zmianom właściwości fizykochemicznych matryc w wyniku sterylizacji. Celem badania było również określenie, czy sterylizacja wpływa na zmiany właściwości fizykochemicznych matryc oraz zmiany w samej cząsteczce leku.

Porównywano liczbowo średnią masę cząsteczkową (M_n) każdej z matryc przed napromienianiem z (M_n) matryc sterylnych (RYS. 1). Zauważono, że masa cząsteczkowa uległa zmniejszeniu po procesie radiacji. Matryce wykonane z P(LA:GA:TMC) charakteryzowały się znacznie większym ubytkiem mas cząsteczkowych niż matryce P(LA:GA:Cap). Ponadto, większy spadek M_n charakteryzował matryce zawierające paklitaxel. Spadek M_n oraz dyspersji (D) można tłumaczyć degradacją krótkich łańcuchów terpolimerowych, która została indukowana napromienianiem. Ponieważ wszystkie próbki były hermetycznie zamknięte, można wykluczyć wpływ reaktywnych form tlenu na ten proces [9].



RYS. 1. Liczbowo średnia masa cząsteczkowa (M_n) matryc przed i po procesie sterylizacji.

FIG. 1. The number average molecular weight (M_n) of non-irradiated and irradiated matrices.

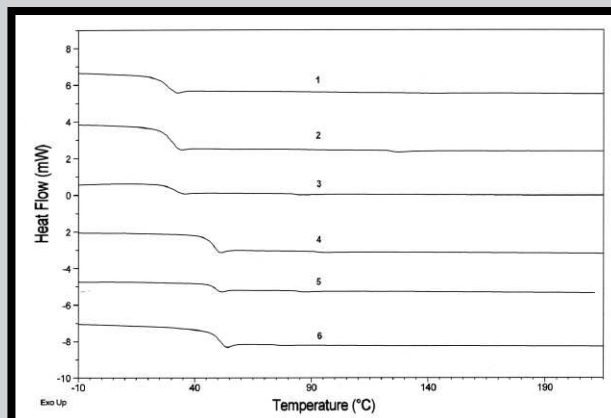
1 – P(LA:GA:Cap), 2 – P(LA:GA:Cap) + 5% of paclitaxel, 3 – P(LA:GA:Cap) + 10% of paclitaxel, 4 – P(LA:GA:TMC), 5 – P(LA:GA:TMC) + 5% of paclitaxel, 6 – P(LA:GA:TMC) + 10% of paclitaxel.

Analiza termogramów nie wykazała punktów topnienia w przypadku próbek przed napromienianiem, wszystkie zatem były całkowicie amorficzne. Temperatura zeszklenia matryc otrzymanych z P(LA:GA:Cap) wynosiła 25°C, a matryc z P(LA:GA:TMC) 45°C. Spadek temperatury zeszklenia wszystkich napromienionych próbek korelował ze spadkiem mas cząsteczkowych. Jakkolwiek, matryce z P(LA:GA:TMC) charakteryzował większy spadek temperatury zeszklenia niż matryc wykonanych z P(LA:GA:Cap), co jest również spowodowane wyższym ubytkiem masy cząsteczkowej. Na termogramach sterylnych matryc zawierających paklitaxel otrzymanych z obydwu rodzajów terpolimerów stwierdzono punkty topnienia, co świadczy o pojawieniu się frakcji krystalicznych podczas promieniowania elektronowego. Trzeba jednak zaznaczyć, iż entalpia topnienia (ΔH_m) była bardzo nieznaczna (około 5,5 J/g) (RYS. 2).

Skład molowy terpolimerów zdeterminowano za pomocą spektroskopii NMR. Nie stwierdzono różnic w składzie komonomerów pomiędzy trzema rodzajami niesterylnych matryc, które otrzymano z obu typów terpolimerów.

The number average molecular weight (M_n) of each type of matrices before irradiation was compared with M_n of sterile matrices (FIG. 1). It was noticed that the number average molecular weight generally decreased after irradiation. The matrices obtained from PLAGATMC characterized more significant decrease of molecular mass than the P(LA:GA:Cap) matrices. Moreover, higher decrease of M_n was noticed in the case of matrices containing paclitaxel. The decrease of M_n and molecular mass dispersity (D) can be explained by degradation of short terpolymer chains induced by the radiation. Since all of the specimens were hermetically sealed, the influence of reactive oxygen species (ROS) on the degradation rate was minimised [9].

Differential scanning calorimetry (DSC) analysis revealed that all of the matrices before radiation did not exhibit a melting peak. Thus, all of them were totally amorphous with the glass-transition temperature (T_g) of 25°C in the case of P(LA:GA:Cap) and 45°C for P(LA:GA:TMC). The decrease of glass-transition temperature in all of the radiated samples was observed and it corresponded to decrease of molecular weight. However, the P(LA:GA:TMC) matrices characterized higher glass-transition temperature decrease than the P(LA:GA:Cap) matrices, which was connected to higher decrease of the number average molecular weight. The thermograms of sterile paclitaxel-loaded matrices obtained from both kind of materials, very small melting peaks were identified, however the enthalpies of melting (ΔH_m) were very low (about 5,5 J/g). It was assumed the small crystalline phase was formed during EB radiation. However, none of the investigated matrices had the tendency to reconstitution of crystalline parts since melting peaks were not observed during the second scan (FIG. 2).



RYS. 2. Termogamy DSC matryc po procesie sterylizacji (otrzymane z drugiego skanu).

FIG. 2. DSC thermograms of matrices after sterilization (obtained from the second scan).

1 – P(LA:GA:Cap), 2 – P(LA:GA:Cap) + 5% of paclitaxel, 3 – P(LA:GA:Cap) + 10% of paclitaxel, 4 – P(LA:GA:TMC), 5 – P(LA:GA:TMC) + 5% of paclitaxel, 6 – P(LA:GA:TMC) + 10% of paclitaxel.

Terpolymers' composition was determined by means of ^1H NMR spectroscopy. There were no differences in comonomer molar ratio between 3 kinds of non-radiated matrices (with 5, 10% of paclitaxel and drug free matrices), obtained from each type of investigated terpolymers. The composition of all of the P(LA:GA:TMC) matrices did not change after sterilization, regardless the paclitaxel loading. In the case of all matrices obtained from (poly(L-lactide-co-glycolide-co- ϵ -caprolactone) (44:32:24)), lactidyl units content increase and caprolyl units decrease was noticed. It can be assumed that caprolyl units are more susceptible to EB radiation than the carbonate ones.

Udział molowy komonomerów wszystkich matryc przygotowanych z P(LA:GA:TMC) nie uległ zmianie po sterylizacji. W przypadku wszystkich matryc sporządzonych z poli(L-laktyd-ko-glikolid-ko-ε-kaprolaktanu) (44:32:24) obserwowano wzrost zawartości jednostek laktydylowych oraz spadek zawartości jednostek kaproilowych. Można przypuszczać, że jednostki kaproilowe są bardziej wrażliwe na promieniowanie elektronowe, niż jednostki węglanowe.

Nie obserwowano istotnych różnic w liczbowo średniej masie cząsteczkowej, rozrzucie mas cząsteczkowych oraz temperaturze zeszklenia pomiędzy sterylnymi matrycami zawierającymi paklitaksel i sterylnymi matrycami bez leku. Ponieważ nie odnotowano zmian w składzie komonomerów matryc otrzymanych z P(LA:GA:TMC), może to wskazywać na mały wpływ obecności paklitakselu na proces sterylizacji. Ponadto, analiza NMR nie wykazała zmian w cząsteczce leku w napromienianych matrycach. Wzrost zawartości jednostek laktydylowych i ubytek jednostek kaproilowych w matrycach wykonanych z P(LA:GA:Cap) może wpływać na szybkość degradacji, a zatem i na profil uwalniania leku.

Wnioski

Otrzymano trzy rodzaje matryc (z 5%, 10% zawartością leku oraz matryc bez leku) z dwóch typów terpolimerów. Próbkę sterylizowano za pomocą promieniowania elektronowego. Proces sterylizacji matryc z paklitakseliem i matryc bez leku nieznacznie wpłynął na liczbowo średnią masę cząsteczkową, rozrzut mas cząsteczkowych oraz właściwości termiczne. Wartości wszystkich tych parametrów uległy obniżeniu po procesie napromieniania. Otrzymane wyniki sugerują, iż zawartość leku nie ma znaczącego wpływu na właściwości fizykochemiczne terpolimerów w czasie sterylizacji. Ponadto, analiza NMR nie wykazała zmian w cząsteczce leku zawartego w napromienianych matrycach. Zmiany w składzie molowym komonomerów obserwowano tylko w przypadku matryc otrzymanych z P(LA:GA:Cap), co może wskazywać na większą wrażliwość jednostek kaproilowych na promieniowanie. To może z kolei mieć wpływ na proces degradacji, a tym samym na uwalnianie paklitakselu z wysterylizowanych matryc.

Wyniki niniejszego badania mogą być pomocne w selekcji metody sterylizacji systemów uwalniających paklitaksel.

Podziękowania

Badania zrealizowano w ramach projektu MEMSTENT (Grant No: UDA-POIG.01.03.01-00-123/08-03).

No significant differences between the number average molecular weight (M_n), molecular mass dispersity (D), glass-transition temperature (T_g) of paclitaxel-loaded sterile matrices and drug free sterile matrices were noticed. There were no changes in comonomer molar ratio in the case of P(LA:GA:TMC) matrices before and after sterilization that indicated insignificant effect of paclitaxel content during sterilization. Lactidyl units content increase and caprolyl units decrease of P(LA:GA:Cap) radiated matrices was observed that may influence on the drug release profile. The NMR analysis did not reveal any change in drug molecule after sterilization.

Conclusions

In this study two terpolymers were used to obtain three types of matrices (with 5%, 10% of paclitaxel and drug free matrices). The matrices were sterilized with the use of EB radiation and investigated. Sterilization of paclitaxel-loaded matrices as well as drug free matrices insignificantly influenced the number average molecular weight (M_n), molecular mass dispersity (D) and also thermal properties. All of the mentioned parameters decreased after irradiation with the use of electron beam radiation. The obtained results suggested that drug content did not affect significantly on physicochemical properties of terpolymers during sterilization process. Moreover, the NMR analysis did not reveal any change in drug molecule after sterilization. The changes of polymer composition were observed only in the case of P(LA:GA:Cap) matrices, which suggested higher susceptibility to radiation of caprolyl units. This may influence the degradation process and thus, the paclitaxel release from sterilized matrices.

The results of this study may be helpful in selection of sterilization method for paclitaxel delivery terpolymeric systems.

Acknowledgments

This study has been financially supported by MEMSTENT (Grant No: UDA-POIG.01.03.01-00-123/08-03).

Piśmiennictwo

- [1] Alexis F., Venkatraman S. S., Rath K. S., Boey F.: In vitro study of release mechanisms of paclitaxel and rapamycin from drug-incorporated biodegradable stent matrices, *Journal of Controlled Release* 98 (2004) 67-74.
- [2] Lao L. L., Venkatraman S. S.: Adjustable paclitaxel release kinetics and its efficacy to inhibit smooth muscle cells proliferation, *Journal of Controlled Release* 130 (2008) 9-14.
- [3] Gogolewski S., Mainil-Varlet P. The effect of thermal treatment on sterility, molecular and mechanical properties of various polylactides. 2. Poly(L/D-lactide) and poly(L/DL-lactide), *Biomaterials* 18 (1997) 251-255.
- [4] Mendes G. C. C., Brandão T. R. S., Silva C. L. M.: Ethylene oxide sterilization of medical devices: A review, *American Journal of Infection Control* 35 (2007) 574-58.
- [5] Çalıy S., Bozdağ S., Kaç H. S., Tunçay M., Hıncal A. A.: Influence of irradiation sterilization on poly(lactide-co-glycolide) microspheres containing anti-inflammatory drugs, *II Farmaco* 57 (2002) 55-62.

References

- [6] Bero M., Dobrzyński P., Kasperczyk J.: Application of zirconium (IV) acetylacetonate to the copolymerization of glycolide with ε-caprolactone and lactide, *Polymer Bulletin* 42 (1999) 131-139.
- [7] Zini E., Scandola M., Dobrzyński P., Kasperczyk J., Bero M.: Shape Memory Behavior of Novel (l-Lactide-Glycolide-Trimethylene Carbonate) Terpolymers, *Biomacromolecules* 8 (2007) 3661-3667.
- [8] Lu X. L., Sun Z. J., Cai W., Gao Z. Y.: Study on the shape memory effects of poly(L-lactide-co-ε-caprolactone) biodegradable polymers, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 19 (2008) 395-399.
- [9] Montanari L., Cilurzo F., Valvo L., Faucitano A., Buttafava A., Groppo A., Genta I., Conti B.: Gamma irradiation effect on stability of poly(lactide-co-glycolide) microspheres containing clonazepam, *Journal of Controlled Release* 75 (2001) 317-330.