

BIODEGRADOWALNE POLIURETANOWE NOŚNIKI CITROPINY - OTRZYMYWANIE, BADANIA FIZYKOCHEMICZNE I BIOLOGICZNE

URSZULA PIOTROWSKA¹, MARCIN SOB CZAK^{2*}, CEZARY DĘBEK³

¹ WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY,
WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY,
KATEDRA I ZAKŁAD CHEMII NIEORGANICZNEJ I ANALITYCZNEJ,
UL. BANACHA 1, 02-097 WARSZAWA

² UNIWERSYTET TECHNOLOGICZNO-HUMANISTYCZNY W RADOMIU,
KATEDRA CHEMII, ZAKŁAD CHEMII ORGANICZNEJ,
UL. CHROBREGO 27, 26-600 RADOM

³ INSTYTUT INŻYNIERII MATERIAŁÓW POLIMEROWYCH I BARWNIKÓW,
UL. MARII SKŁODOWSKIEJ-CURIE 55, 87-100 TORUŃ

* E-MAIL: MARCIN.SOB CZAK@WP.PL

Streszczenie

Poważnym problemem współczesnej medycyny jest rosnąca lekooporność mikroorganizmów. W związku z powyższym, w ostatnich latach technologia polimerowych materiałów o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych jest jednym z najszybciej rozwijających się obszarów farmacji i inżynierii biomedycznej. Biomateriały te są stosowane w wielu aplikacjach, szczególnie w urządzeniach medycznych oraz technologii systemów dostarczania leków. Peptydy stanowią perspektywiczną grupę związków o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych, które mogą być stosowane w technologii wspomnianych materiałów. W niniejszej pracy, otrzymano nowe porowate poliuretanowe nośniki citropiny (CT). Nietoksyczne biodegradowalne poliuretany (PU) zsyntetyzowano przy użyciu dioli poli(ε-kaprolaktonu), polilaktydu i poli(adypinianu etylenu) oraz 1,6-diizocyjanianu heksametylenu i butano-1,4-diolu. Otrzymane PU zostały scharakteryzowane za pomocą technik ¹H i ¹³C NMR. Wyznaczono masę cząsteczkową i właściwości mechaniczne zsyntetyzowanych biomateriałów. Przeprowadzono badania uwalniania CT z porowatych PU w warunkach *in vitro*. Stwierdzono, że wszystkie otrzymane matryce PU są nietoksyczne w stosunku do bakterii luminescencyjnych *V. fischeri* oraz pierwotniaków *S. ambiguum* i *T. termophila*. Procent uwolnionej CT z uzyskanych porowatych PU, w ciągu 8 tygodni procesu biodegradacji, wynosił od 29% do 79%. Ponadto, wykazano dobrą korelację pomiędzy kinetyką uwalniania CT z matryc a ubytkiem masy porowatych PU. Podsumowując, można stwierdzić, że szybkość uwalniania CT z porowatych materiałów zależy głównie od rodzaju polioliu użytego w syntezie PU. Uzyskane wstępne wyniki badań sugerują, że otrzymane układy stanowią nowe, obiecujące biomateriały jako potencjalne systemy kontrolowanego uwalniania substancji przeciwdrobnoustrojowych.

Słowa kluczowe: poliuretany biodegradowalne, citropina, peptydy przeciwdrobnoustrojowe, polimery przeciwbakteryjne, kontrolowane uwalnianie substancji przeciwbakteryjnych

[Inżynieria Biomateriałów 124 (2014) 29-35]

BIODEGRADABLE POLYURETHANE CARRIERS OF CITROPIN - PREPARATION, PHYSICO- CHEMICAL AND BIOLOGICAL CHARACTERIZATION

URSZULA PIOTROWSKA¹, MARCIN SOB CZAK^{2*}, CEZARY DĘBEK³

¹ MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW, FACULTY OF PHARMACY,
DEPARTMENT OF INORGANIC AND ANALYTICAL CHEMISTRY,
UL. BANACHA 1, 02-097 WARSAW, POLAND

² KAZIMIERZ PULASKI UNIVERSITY OF TECHNOLOGY
AND HUMANITIES IN RADOM, CHAIR OF CHEMISTRY,
DEPARTMENT OF ORGANIC CHEMISTRY,
UL. CHROBREGO 27, 26-600 RADOM, POLAND

³ INSTITUTE FOR ENGINEERING OF POLYMER MATERIALS AND DYES,
UL. MARII SKŁODOWSKIEJ-CURIE 55, 87-100 TORUŃ, POLAND

* E-MAIL: MARCIN.SOB CZAK@WP.PL

Abstract

Particularly problematic of the present medicine are more and more growing drug-resistant microorganisms. Therefore, in the recent years technology of polymeric materials with antimicrobial activity represents one of the most rapidly advancing areas in pharmacy and biomedical engineering. These biomaterials are used in many fields, particularly in medical devices and technology of drug delivery systems. One of the perspective group of antimicrobial substances, which could be used in technology of these materials, are peptides. New porous polyurethane carriers of citropin (CT) were obtained. Non-toxic biodegradable polyurethane (PU) were synthesized from poly(ε-caprolactone), polylactide or poly(ethylene adipate) diols, 1,6-hexamethylene diisocyanate and butanediol. The obtained PU was characterized by ¹H and ¹³C NMR techniques. The molecular weight and mechanical properties of the obtained biomaterials were reported. The controlled release of CT from porous PU was studied *in vitro*. It was found that all prepared PU matrices are non toxic to the luminescent bacteria *V. fischeri* and two ciliated protozoa *S. ambiguum* and *T. termophila*. The percentage of CT released from prepared porous PU was 29% to 79% after 8 weeks. Moreover, the results directly comparing CT release with mass loss of obtained porous PU studies follow the same trend. Summing up, the release rates of the CT from porous materials were shown to be directly dependent on the nature of polyol used in the synthesis of PU. The preliminary results suggest that these novel biomaterials are promising for application as antimicrobial substance delivery systems.

Keywords: biodegradable polyurethanes, citropin, peptides with antimicrobial activity, antibacterial polymers, antibacterial substances controlled release

[Engineering of Biomaterials 124 (2014) 29-35]

Materiały poliuretanowe (PU) wykazujące aktywność przeciwdrobnoustrojową znajdują szerokie zastosowanie w aplikacjach biomedycznych, zwłaszcza w systemach kontrolowanego uwalniania substancji leczniczych, produktach ochrony zdrowia, higieny lub technologiach urządzeń medycznych [1-5]. W ostatnich latach obserwuje się wzrost zainteresowania peptydami o aktywności przeciwdrobnoustrojowej (AMP) [1]. Technologie wykorzystujące materiały polimerowe jako nośniki AMP, są jednymi z najszybciej rozwijających się gałęzi farmacji stosowanej i medycyny.

Biodegradowalne poliuretany stanowią interesujące biomateriały, co jest związane z ich właściwościami fizycznymi, chemicznymi i biologicznymi. PU są stosowane w inżynierii tkankowej tkanek miękkich i systemach kontrolowanego uwalniania substancji leczniczych [6-8]. PU zawierają w swojej strukturze segmenty giętkie (np. jednostki poliestrowe lub poliwęglanowe) oraz segmenty sztywne (jednostki uretanowe i fragmenty tzw. przedłużacza łańcucha). Jako składniki diizocyjanianowe stosowane są 1,4-diizocyjanian tetrametyleny, 1,6-diizocyjanian heksametyleny, diizocyjanian izoforanu, diizocyjanian 4,4'-dicykloheksametyleny i diizocyjanian L-lizyny [6]. Diole poliestrowe i poliwęglanowe są zazwyczaj syntetyzowane w reakcji polimeryzacji z otwarciem pierścienia prowadzonej w obecności katalizatorów kationowych, anionowych, koordynacyjnych oraz enzymatycznych. Alternatywnie, PU mogą być otrzymywane metodą bezizocyjanianową, polegającą na reakcji pięcioczłonowych cyklicznych węglanów z diaminami [9,10].

Citropina (CT) (sekwencja aminokwasów: Gly-Leu-Phe-Asp-Val-Ile-Lys-Lys-Val-Ala-Ser-Val-Ile-Gly-Gly-Leu-NH₂) jest jednym z najbardziej aktywnych AMP, wykazującym szerokie spektrum działania antybakteryjnego. Naturalna citropina 1.1 jest produkowana zarówno przez gruczoły podbródkowe, jak i grzbietowe zielonej żaby drzewiastej *Litoria citropa* [11].

W niniejszej pracy opisano metodę otrzymywania porowatych biodegradowalnych poliuretanów jako nośników CT. Mamy nadzieję, że otrzymane materiały znajdą zastosowanie w systemach kontrolowanego uwalniania AMP.

Materiały i metody

Materiały

3,6-Dimetylo-1,4-dioksan-2,5-dion (98%, *rac*-laktyd, *rac*-LA, Aldrich Polska) krystalizowano z mieszaniny suchego toluenu z heksanem i suszono pod zmniejszonym ciśnieniem. ϵ -Kapolakton (99%, 2-oksepanon, CL, Aldrich Polska) i toluen (POCh Polska) przed użyciem suszono i destylowano nad CaH₂ pod zmniejszonym ciśnieniem. 2-etyloheksanian cyny (II) (95%, oktanian cyny, SnOct₂, Aldrich Polska), dichlorometan (CH₂Cl₂, POCh Polska), metanol bezwodny (POCh Polska), 1,6-diizocyjanian heksametyleny (98%, HDI, Aldrich Polska), poli(adypinian etyleno)diol (PEAD diol, M_n = 1000 Da, Aldrich Polska), butano-1,4-diol (98%, BD, Fluka Polska), 1,4-diazabicyklo[2.2.2]oktan (99%, DABCO, Aldrich Polska), etanol (POCh Polska), izopropanol (POCh Polska), dimetylosulfotlenek (99%, DMSO, Aldrich Polska) użyto bez oczyszczania. Citropinę (CT) zsyntetyzowano (w Gdańskim Uniwersytecie Medycznym) metodą Fmoc (9-fluorenylmetoksykarbonyl) w reaktorze mikrofalowym na nośniku polistyrenowym (żywica polistyrenowa modyfikowana linkerem Rink-amidowym) [12].

Introduction

Polyurethane (PU) materials with antimicrobial activity are used in many biomedical fields, particularly in drug delivery systems, health care products, hygienic applications or medical device technology [1-5]. The last years have seen growing interest in the investigation of peptides with antimicrobial activity (AMP) [1]. Technology of polymeric materials as AMP carriers represents one of the most rapidly advancing areas in pharmacy or medicine.

Biodegradable polyurethanes are very interesting biomaterials which characterize physical, chemical and biological properties. PU has been used e.g. in soft tissue engineering and controlled drug delivery systems [6-8]. PU consists of soft segments (e.g. polyester, polycarbonate units) and hard segments (urethanes and chain extender units). As diisocyanate components are used 1,4-butane diisocyanate, 1,6-hexamethylene diisocyanate, isophorone diisocyanate, 4,4'-dicyklohexamethylene diisocyanate and L-Lysine ethyl ester diisocyanate [6]. Moreover, the polyester or polycarbonate diols are usually prepared by ring-opening polymerization in the presence of cationic, anionic, enzymes or coordination catalysts. Alternatively, PU can be prepared by non-isocyanate methods, if five-membered cyclic carbonate groups are reacted with diamines [9,10].

Citropin (CT) (amino acid sequence: Gly-Leu-Phe-Asp-Val-Ile-Lys-Lys-Val-Ala-Ser-Val-Ile-Gly-Gly-Leu-NH₂) is one of the most active AMP, which shows significant broad-spectrum antibacterial activity. Natural citropin 1.1 is produced by both the dorsal and submental glands of the green tree frog *Litoria citropa* [11].

In this paper, we describe the synthesis of a series of porous biodegradable polyurethanes as CT carriers. We believe that the obtained biomaterials can find practical applications as effective AMP delivery systems.

Materials and Methods

Materials

3,6-Dimethyl-1,4-dioxane-2,5-dione (*rac*-lactide, *rac*-LA, Aldrich 98%) was crystallized from a mixture of dry toluene with hexane and dried under vacuum. ϵ -Caprolactone (2-oxepanone, 99%, CL, Aldrich Poland) and toluene (POCh Poland) were dried and distilled over CaH₂ at reduced pressure before use. Stannous octoate (tin (II) 2-ethylhexanoate, SnOct₂, Aldrich 95%), dichloromethane (CH₂Cl₂, POCh Poland), anhydrous methanol (POCh Poland), 1,6-hexamethylene diisocyanate (HDI, 98%, Aldrich Poland), poly(ethylene adipate) diol (PEAD diol, M_n = 1000 Da, Aldrich Poland), 1,4-butanediol (BD, 98%, Fluka Poland), 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane (DABCO, 99%, Aldrich Poland), ethanol (POCh Poland), isopropanol (POCh Poland), dimethyl sulfoxide (DMSO, 99%, Aldrich Poland) were used without further purification. Citropin (CT) was synthesized (in Medical University of Gdansk) in a microwave reactor using the Fmoc (9-fluorenylmetoxycarbonyl) chemistry on polystyrene resin modified by Rink Amide linker [12].

Synthesis and characterization of polyols

Polyols (PLA, PCL) were synthesized by ring opening polymerization of CL or *rac*-LA in the presence of SnOct₂ as an initiator and BD as a co-initiator. Monomers (CL, *rac*-LA, 100 mmol), SnOct₂ and BD were placed in a 20 mL glass ampoules under argon atmosphere. The reaction vessel was then kept standing in a thermostated oil bath at 140°C for 24 h. When the reaction time was completed, the reaction product was dissolved in CH₂Cl₂, then precipitated from cold methanol using diluted hydrochloric acid (5% aqueous solution) and finally dried under vacuum for one week.

Synteza i charakterystyka polioli

Poliiole (PLA, PCL) syntetyzowano metodą polimeryzacji z otwarciem pierścienia CL lub *rac*-LA w obecności SnOct₂ jako inicjatora i BD jako koinicjatora. Monomery (CL, *rac*-LA, 100 mmol), SnOct₂ i BD umieszczano w szklanych ampułkach o pojemności 20 mL w atmosferze argonu. Następnie ampułki termostatowano w łaźni olejowej w temp. 140°C przez 24 godz. Po zakończeniu reakcji, polimer rozpuszczano w CH₂Cl₂, a następnie wytrącano z zimnego metanolu z dodatkiem rozcieńczonego kwasu solnego (5% roztwór wodny). Finalny produkt suszono przez około tydzień w temp. pokojowej pod zmniejszonym ciśnieniem.

Analiza NMR PCL

¹H NMR (CDCl₃, δ, ppm):
 4.03 [2H, t, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂OC(O)-],
 3.70 [2H, t, -CH₂OH, grupa końcowa],
 2.27 [2H, t, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂COO-],
 1.61 [4H, m, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂COO-],
 1.36 [2H, m, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂COO-];
¹³C NMR (CDCl₃, δ, ppm):
 173.3 [-C(O)O-], 63.9 [-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂OC(O)-],
 33.8 [-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂COO-],
 28.1 [-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂OC(O)-],
 25.4 [-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂COO-],
 24.4 [-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂COO-].

Analiza NMR PLA

¹H-NMR (CDCl₃, δ, ppm):
 5.17 [1H, q, -OCH(CH₃)C(O)O-],
 4.39 [1H, q, -CH(CH₃)OH, grupa końcowa],
 1.50 [3H, q, -CH(CH₃)C(O)O-];
¹³C-NMR (CDCl₃, δ, ppm):
 169.6 [-C(O)O-], 69.0 [-OCH(CH₃)C(O)O-],
 67.1 [-CH(CH₃)OH, grupa końcowa],
 20.9 [-CH(CH₃)C(O)OH], 17.1 [-OCH(CH₃)C(O)O-].

Synteza i charakterystyka poliuretanów

Poliuretany syntetyzowano metodą dwuetapową. Przed reakcją wszystkie reagenty (HDI, poliiole, BD) suszono pod zmniejszonym ciśnieniem przez 2 godz. w temp. 60°C. W pierwszym etapie, otrzymane poliiole (PLA, PCL), HDI, DABCO i bezwodny toluen wprowadzano do trój szyjnej kolby okrągłodennej (o pojemności 150 ml) z mieszadłem magnetycznym. Prepolimer otrzymywano w temp. 80°C przez 4 godz. Następnie, BD w roztworze izopropanolu dodawano powoli do układu reakcyjnego w temp. 40°C przez 3 godz. Poliuretan oczyszczano przez wytrącanie prowadzone przy użyciu mieszaniny toluen/etanol i suszono do stałej masy pod zmniejszonym ciśnieniem w temp. pokojowej.

Analiza NMR PU

¹H NMR (DMSO-d₆, δ, ppm):
 6.86 [1H, s, -OC(O)NH-], 5.15 [1H, q, -OCH(CH₃)C(O)O-],
 4.32 [4H, t, -NHCOO-CH₂CH₂CH₂CH₂OC(O)NH-],
 3.90 [2H, t, -NHC(O)OCH₂-], 3.75-3.65 [4H, m, -NHCOO-CH₂CH₂CH₂CH₂OC(O)NH- i 4H, t, -C(O)OCH₂CH₂O-],
 3.15 [2H, t, -CH₂NHC(O)O-], 2.30-2.25 [2H, t, CH₂CH₂COO-], 1.60-1.50 [2H, m, -CH₂CH₂NHC(O)O- i 4H, m, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂COO- i 3H, q, -CH(CH₃)C(O)O-], 1.40-1.30 [2H, m, -CH₂CH₂CH₂NHC(O)O- i 2H, m, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂COO-];
¹³C NMR (DMSO-d₆, δ, ppm):
 173.2 [-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂C(O)O-],
 169.5 [-OCH(CH₃)C(O)O-], 156.0-156.5 [-NHC(O)O-],
 63.4 [-OC(O)CH₂-], 68.8 [-OCH(CH₃)C(O)O-],
 33.9 [-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂COO-], 29.3 [-CH₂NHC(O)O-],
 28.6 [-NHC(O)NHCH₂-], 24.9-25.9 [-CH₂-],
 20.8 [-CH(CH₃)C(O)OH], 17.0 [-OCH(CH₃)C(O)O-];

NMR data of PCL

¹H NMR (CDCl₃, δ, ppm):
 4.03 [2H, t, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂OC(O)-],
 3.70 [2H, t, -CH₂OH, end group],
 2.27 [2H, t, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂COO-],
 1.61 [4H, m, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂COO-],
 1.36 [2H, m, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂COO-];
¹³C NMR (CDCl₃, δ, ppm):
 173.3 [-C(O)O-], 63.9 [-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂OC(O)-],
 33.8 [-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂COO-],
 28.1 [-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂OC(O)-],
 25.4 [-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂COO-],
 24.4 [-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂COO-];

NMR data of PLA

¹H-NMR (CDCl₃, δ, ppm):
 5.17 [1H, q, -OCH(CH₃)C(O)O-],
 4.39 [1H, q, -CH(CH₃)OH, end group],
 1.50 [3H, q, -CH(CH₃)C(O)O-];
¹³C-NMR (CDCl₃, δ, ppm):
 169.6 [-C(O)O-], 69.0 [-OCH(CH₃)C(O)O-],
 67.1 [-CH(CH₃)OH, end group],
 20.9 [-CH(CH₃)C(O)OH], 17.1 [-OCH(CH₃)C(O)O-];

Synthesis and characterization of polyurethanes

PU was synthesized by two-step method. Before reaction all reactants (HDI, polyols, BD) were dried in vacuum for 2 h at 60°C. First, the obtained polyols (PLA, PCL), HDI, DABCO and anhydrous toluene were added into a 150 ml three-neck round-bottomed flask with magnetic stirrer. The prepolymer was obtained at 80°C for 4 h. Next, BD dissolved in isopropanol, was added into reaction system slowly for chain extension at 40°C for 3 h. The PU was purified through co-precipitation of toluene/ethanol and vacuum dried to constant weight at room temperature.

NMR data of PU

¹H NMR (DMSO-d₆, δ, ppm):
 6.86 [1H, s, -OC(O)NH-], 5.15 [1H, q, -OCH(CH₃)C(O)O-],
 4.32 [4H, t, -NHCOO-CH₂CH₂CH₂CH₂OC(O)NH-], 3.90 [2H, t, -NHC(O)OCH₂-], 3.75-3.65 [4H, m, -NHCOO-CH₂CH₂CH₂CH₂OC(O)NH- and 4H, t, -C(O)OCH₂CH₂O-],
 3.15 [2H, t, -CH₂NHC(O)O-], 2.30-2.25 [2H, t, CH₂CH₂COO-], 1.60-1.50 [2H, m, -CH₂CH₂NHC(O)O- and 4H, m, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂COO- and 3H, q, -CH(CH₃)C(O)O-], 1.40-1.30 [2H, m, -CH₂CH₂CH₂NHC(O)O- and 2H, m, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂COO-];
¹³C NMR (DMSO-d₆, δ, ppm): 173.2 [-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂C(O)O-], 169.5 [-OCH(CH₃)C(O)O-], 156.0-156.5 [-NHC(O)O-], 63.4 [-OC(O)CH₂-], 68.8 [-OCH(CH₃)C(O)O-], 33.9 [-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂COO-], 29.3 [-CH₂NHC(O)O-], 28.6 [-NHC(O)NHCH₂-], 24.9-25.9 [-CH₂-], 20.8 [-CH(CH₃)C(O)OH], 17.0 [-OCH(CH₃)C(O)O-];

Preparation of polyurethane carriers of citropin

PU was first dissolved in DMSO at a concentration of 20% (w/v). Next, the PU solution was mixed with NaCl (0.2 g of NaCl crystals per 1 g of PU). The PU/salt mixture was poured into mould. Next, the material was dried under vacuum at 50°C for 48 h. The samples were washed for 24 h in distilled water to remove the salt crystals. Next, PU samples were later dried in a vacuum for at room temperature for about two week.

CT was incorporated into the PU by immersing the material into CH₂Cl₂ solution of peptide (of known concentration). The solution was pulled into the pores of the PU by repeated 5 cycles of vacuum/argon. PU was dried under vacuum at room temperature until the weight of impregnated materials remained unchanged.

Otrzymywanie poliuretanowych nośników citropiny

Poliuretan początkowo rozpuszczano w DMSO (stężenie ok. 20% wag./obj.). Uzyskany roztwór mieszano z NaCl (0,2 g soli na 1 g PU). Mieszaninę PU/sól przenoszono do formy. Następnie, materiał suszono pod zmniejszonym ciśnieniem w temp. 50°C przez 48 godz. Próbkę przemycano wodą destylowaną przez 24 godz. w celu usunięcia soli. Następnie, PU suszono pod zmniejszonym ciśnieniem w temp. pokojowej przez około 2 tygodnie.

CT wprowadzano do matrycy PU poprzez zanurzenie materiału w roztworze CH_2Cl_2 zawierającym peptyd (o znanym stężeniu). Następnie, wykonano 5 kolejnych cykli - próżnia/argon. Nośnik PU suszono do stałej masy pod zmniejszonym ciśnieniem w temp. pokojowej.

Uwalnianie citropiny z nośników poliuretanowych w warunkach in vitro

Poliuretanowe nośniki CT zostały poddane inkubacji w roztworze PBS (pH 7,4, w stosunku 25 mg polimeru: 1 ml buforu), w temp. 37°C. Zawartość kolby poddawano ciągłemu mieszaniu, a następnie próbki pobierano w odpowiednich sekwencjach czasowych, stosując metodę całkowitej wymiany buforu. Ilość uwolnionej CT wyznaczano w oparciu o krzywą wzorcową sporządzoną na podstawie pomiarów wykonanych metodą spektrofotometrii UV-VIS ($\lambda_{\text{max}} = 266 \text{ nm}$). Próbkę PU (próbki kontrolne), poddano procesowi biodegradacji w warunkach analogicznych, jakie zastosowano w przypadku poliuretanowych nośników CT. Stopień degradacji PU został oceniony na podstawie zmian wartości lepkościowo średniej masy cząsteczkowej (M_w) i ubytku masy próbki (WL).

Metody badań

Widma ^1H i ^{13}C NMR polioli i PU zostały wykonywane przy użyciu spektrometru Varian 300 MHz stosując CDCl_3 lub DMSO-d_6 jako rozpuszczalnik.

Średnią masę cząsteczkową i rozkład masy cząsteczkowej polioli oznaczano wykorzystując chromatograf żelowy (GPC Max + TDA 305/Viscotek), wyposażony w kolumny Jordi DVB Mixed Bed (jedna osłona) w temp. 30°C, w dichlorometanie (HPLC, Sigma Aldrich Polska), przy szybkości przepływu 1 ml/min z detekcją RI i kalibracji opartej na wąskich standardach PS (ReadyCal Set, Fluka). Wyniki opracowano za pomocą oprogramowania OmniSEC (ver. 4.7).

Lepkościowo średnią masę cząsteczkową PU wyznaczano na podstawie równania Marka-Houwinka dla następujących stałych: $K = 6,80 \times 10^{-5} \text{ dl/g}$ i $\alpha = 0,86$. Lepkość PU mierzono w *N,N*-dimetyloformamidzie (w temp. 30°C) za pomocą wiskozymetru Stabinger Viscometer SVM 3000 [13].

Testy cytotoksyczności PU oraz liczbę hydroksylową polioli przeprowadzono zgodnie z metodykami opisanymi we wcześniejszych doniesieniach [14,15].

Właściwości mechaniczne (wytrzymałość na rozciąganie (FS), naprężenie przy wydłużeniu o 100% (S_{100}), wydłużenie przy zerwaniu (E_b) oraz twardość Shore'a A (ShH) mierzono przy użyciu testera Zwick model 1445. FS, S_{100} i E_b wyznaczano zgodnie z normą PN-ISO 37:2007. ShH została zmierzona zgodnie z normą PN-80/C-04238.

Gęstość i porowatość PU oznaczono metodą wypierania cieczy [16].

Ilość uwolnionej CT z nośników PU oznaczano za pomocą spektrofotometru UV (Shimadzu UV-1202). Pomiar absorbancji powtarzano trzykrotnie przy długości fali 266 nm. Stężenie CT obliczono na podstawie krzywej kalibracyjnej.

Wartość WL obliczano według równania:

$$WL = [(W - W_1)/W] \times 100 (\%),$$

gdzie: *W* - masa pierwotnej próbki polimeru (przed degradacją), W_1 - masa próbki polimeru po degradacji.

In vitro citropin release from polyurethane carriers

The CT-loaded PU was incubated in a PBS (pH 7.4) in the ratio of 25 mg of polymer: 1 ml of buffer at 37°C. The mixture was stirred under constant agitation and a sample was removed at selected intervals followed by fresh buffer replacing. The quantity of the released CT was determined (at the λ_{max} value of 266 nm) from the calibration curve previously obtained under the same conditions and analyzed by means of UV-Vis spectrophotometer. The PU (control samples) were formed and run under the same experimental conditions as reported in the CT release from CT-loaded PU analysis. The degree of the PU degradation was evaluated by change of viscosity average molecular weight (M_v) and their weight loss (WL).

Measurements

^1H and ^{13}C NMR spectra of polyols and PU were obtained on Varian 300 MHz spectrometer using CDCl_3 or DMSO-d_6 as solvent.

The molar mass and molar mass distributions of the polyols were determined using GPC instrument (GPC Max + TDA 305, Viscotek), equipped with Jordi DVB Mixed Bed columns (one guard and two analytical) at 30°C in dichloromethane (HPLC grade, Sigma-Aldrich), at flow rate of 1 ml/min with RI detection and calibration based on narrow PS standards (ReadyCal Set, Fluka). Results were processed with OmniSEC software (ver. 4.7).

The viscosity average molecular weight of PU was calculated from the Mark-Houwink equation using the following constants: $K = 6.80 \times 10^{-5} \text{ dL/g}$ and $\alpha = 0.86$. PU viscosity was measured in *N,N*-dimethylformamide (at 30°C) on Stabinger Viscometer SVM 3000 [13].

The toxicity tests of PU and the hydroxyl number of polyols were carried out according to the procedures described in our early papers [14,15].

Mechanical properties (tensile strength (FS), stress at 100% elongation (S_{100}), elongation at break (E_b) and Shore's A hardness (ShH) were measured using an Zwick model 1445 tester. FS, S_{100} and E_b were determined according to national standard PN-ISO 37:2007. ShH was determined according to national standard PN-80/C-04238.

The density and porosity values of the PU were measured by liquid displacement method [16].

The amount of CT released from the PU was analyzed using a UV spectrophotometer (UV-1202 Shimadzu). The absorbance was determined in triplicate at 266 nm. The calibration curves for CT release were created in PBS as a control.

The WL was calculated according to the equation:

$$WL = [(W - W_1)/W] \times 100 (\%),$$

where: *W* - the weight of dry polymer sample before degradation, W_1 - the weight of dry polymer sample after degradation.

Results and Discussions

In the first step, PCL and PLA diols were obtained by the ring-opening polymerization of corresponding cyclic esters in the presence of SnOct_2 as an initiator and BD as a co-initiator. The molar ratio of CL(or rac-LA) /BD/ SnOct_2 was 50 : 2 : 1 (PCL-1, PLA-1) and 100 : 2 : 1 (PCL-2, PLA-2). The structure of the obtained products was characterized by $^1\text{H-NMR}$ or $^{13}\text{C-NMR}$ spectroscopy (experimental section). The molecular weight (M_n) values of polyols determined by the GPC method were 2400 g/mol for PCL-1, 2300 g/mol for PLA-1, 4600 g/mol for PCL-2 and 4300 g/mol for PLA-2, respectively. Moreover, the M_n values calculated from hydroxyl number were 2600 g/mol for PCL-1, 2400 g/mol for PLA-1, 4200 g/mol for PCL-2 and 3900 g/mol for PLA-2.

Wyniki i dyskusja

W pierwszym etapie, otrzymywano diole PCL i PLA w wyniku polimeryzacji z otwarciem pierścienia odpowiednich cyklicznych estrów. Proces prowadzono w obecności SnOct_2 jako inicjatora oraz BD jako koinicjatora reakcji. Stosunek molowy CL(lub rac-LA)/BD/ SnOct_2 wynosił 50:2:1 (PCL-1, PLA-1) oraz 100:2:1 (PCL-2, PLA-2). Struktura otrzymanych produktów polireakcji została potwierdzona za pomocą spektroskopii ^1H i ^{13}C NMR (część eksperymentalna). Liczbowo średnia masa cząsteczkowa (M_n) polioli wyznaczona za pomocą techniki GPC wynosiła odpowiednio 2400 g/mol dla PCL-1, 2300 g/mol dla PLA-1, 4600 g/mol dla PCL-2 i 4300 g/mol dla PLA-2. Z kolei, wartość M_n obliczona na podstawie oznaczonej liczby hydroksylowej wynosiła 2600 g/mol dla PCL-1, 2400 g/mol dla PLA-1, 4200 g/mol dla PCL-2 i 3900 g/mol dla PLA-2.

W kolejnym etapie, zsyntetyzowano serie PU stosując diole PCL, PLA oraz komercyjny PEAD jako składniki segmentów giętkich oraz HDI i BD jako składniki segmentów sztywnych. Jako katalizator poliaddycji zastosowano DABCO (TABELA 1). PU otrzymywano metodą dwuetapową w toluenie jako medium reakcyjnym. Stosunek HDI:BD:PCL (lub) PLA:PEAD był stały i wynosił 2,5:1,3:0,6:0,6, co odpowiada tzw. indeksowi izocyjanianowemu na poziomie 1,05.

Otrzymano PU-1, PU-2, PU-3, PU-4 o wartości M_v odpowiednio około 74 000, 79 000, 64 000 i 71 000 g/mol (TABELA 1). Przeprowadzono badania wytrzymałości na rozciąganie (FS), naprężenia przy wydłużeniu o 100% (S_{100}), wydłużenia przy zerwaniu (E_b) oraz twardości Shore'a A (ShH) zsyntetyzowanych PU. Otrzymane PU charakteryzowały się FS w zakresie 11,2-14,1 MPa i ShH w zakresie 32-37°ShA. PU-1 i PU-2 cechowały się wydłużeniem przekraczającym 360 %, podczas gdy PU-3 i PU-4 wykazywały wydłużenie poniżej 310%. Podobnie, FS PU zbudowanych z jednostek PCL-1 lub PCL-2 była większa niż w przypadku PU otrzymanych z dioli PLA-1 i PLA-2.

Porowate biodegradowalne poliuretany (Bio-PU) (Bio-PU-1, Bio-PU-2, Bio-PU-3, Bio-PU-4) zostały otrzymane w procesie mieszania odpowiednich PU i NaCl (0,2 g soli na 1 g PU). Gęstość Bio-PU wynosiła odpowiednio 0,211 (Bio-PU-1), 0,221 (Bio-PU-2), 0,193 (Bio-PU-3) i 0,201 (Bio-PU-4) g/cm³. Z kolei, porowatość Bio-PU była zbliżona i wynosiła 61, 64, 58, 59% odpowiednio dla Bio-PU-1, Bio-PU-2, Bio-PU-3 i Bio-PU-4. Poliuretanowe nośniki CT zostały otrzymane przez zanurzenie materiału w roztworze CH_2Cl_2 zawierającym peptyd o znanym stężeniu (zawartość peptydu w każdym Bio-PU wynosiła ok. 1% wag.).

In the second step, PU was synthesized using PCL, PLA and PEAD diols as a soft segment, and HDI and BD as components of the hard segment. DABCO was used as the polyaddition catalysts (TABLE 1). A two-step polymerization procedure was employed to this process (in toluene as medium). The HDI:BD:PCL (or) PLA:PEAD molar ratio was always 2.5:1.3:0.6:0.6, which corresponds to the so called isocyanate index equal 1.05.

As shown in TABLE 1, the PU were obtained with the M_v of about 74 000, 79 000, 64 000 and 71 000 g/mol for PU-1, PU-2, PU-3 and PU-4, respectively. Tensile strength (FS), stress at 100% elongation (S_{100}), Shore hardness (ShH) and stress at 100% elongation at break (E_b) of obtained PU were determined. The obtained PU showed FS in the range of 11.2-14.1 MPa and ShH in the range of 32-37 Shore'a degrees. It was found that PU-1 and PU-2 have better elongations with more than 360% while PU-3 and PU-4 showed an elongation of below 310%. Similarly, FS for PU-based PCL-1 or PCL-2 units are higher values than for PU-based PLA-1 or PLA-2 units.

Porous biodegradable polyurethanes (Bio-PU) (Bio-PU-1, Bio-PU-2, Bio-PU-3, Bio-PU-4) were created by mixing the mixture of PU and NaCl (0.2 g of NaCl crystals per 1 g of PU). The density values of Bio-PU were 0.211 (Bio-PU-1), 0.221 (Bio-PU-2), 0.193 (Bio-PU-3) and 0.201 (Bio-PU-4) g/cm³. In parallel, porosity of Bio-PU was 61, 64, 58 and 59% for Bio-PU-1, Bio-PU-2, Bio-PU-3 and Bio-PU-4, respectively. CT was incorporated into the PU by immersing the material into CH_2Cl_2 solution of peptide of known concentration (the contain peptide in Bio-PU was about 1% wt/wt).

The cytotoxic tests of obtained Bio-PU were carried out. Luminescent bacteria *V. fischeri* and two ciliated protozoa *S. ambiguum* and *T. termophila* [14] were used as biosensors. It was found that obtained Bio-PU are non toxic to all test bionts, both bacteria and protozoa. It was found that all prepared biomaterials are non-toxic (TABLE 2).

CT was immobilized via incorporation into porous PU matrices. CT content in the PU carriers was about 3 wt%. In vitro CT release from the Bio-PU was carried out in PBS buffer at 37°C for 8 weeks. The kinetic rates of CT released from biomaterials were shown in FIG. 1. It has been found that namely the kind of polyol and M_n of polyol used in PU synthesis influence the release of CT from the obtained materials. The percentage of CT released after 8 weeks of incubation was about 29% for the Bio-PU-1 and 38% for the Bio-PU-2. For comparison, the percentage of CT released after 8 weeks of incubation was about 58% for the Bio-PU-3 and 79% for the Bio-PU-4. Near zero-order release of CT from the obtained matrices was observed. This is very interesting result, because zero order or constant rate release of active substance is desirable in order to minimize swings in released peptide concentration. Peptide release is probably result of a combination of erosion and diffusion mechanisms.

TABELA 1. Charakterystyka zsyntetyzowanych poliuretanów.
TABLE 1. Characterization of synthesized polyurethanes.

Nr No.	Poliuretan Polyurethane	Reagenty Reagents	M_v [g/mol]	FS [MPa]	S_{100} [MPa]	E_b [%]	ShH [Shore A]
1.	PU-1	HDI/PEAD/PCL-1/BD	73 900	13.8±0.7	5.3±0.3	368±16	35±3
2.	PU-2	HDI/PEAD/PCL-2/BD	79 600	14.1±0.9	5.7±0.3	392±18	37±3
3.	PU-3	HDI/PEAD/PLA-1/BD	64 100	11.2±0.6	4.1±0.2	291±13	32±2
4.	PU-4	HDI/PEAD/PLA-2/BD	71 400	11.9±0.8	4.6±0.3	308±11	34±2

PCL-1 ($M_n = 2600$ g/mol), PCL-2 ($M_n = 4200$ g/mol), PLA-1 ($M_n = 2400$ g/mol), PLA-2 ($M_n = 3900$ g/mol); M_n - obliczona na podstawie liczby hydroksylowej; M_v - obliczona na podstawie równania Marka-Houwinka dla następujących stałych: $K = 6.80 \times 10^{-5}$ dL/g i $\alpha = 0.86$; FS - wytrzymałość; S_{100} - wytrzymałość przy wydłużeniu o 100%; E_b - wydłużenie przy zerwaniu; ShH - twardość Shore'a.
 M_n - calculated from hydroxyl number; M_v - calculated from the Mark-Houwink equation using the following constants: $K = 6.80 \times 10^{-5}$ dL/g and $\alpha = 0.86$; FS - tensile strength; S_{100} - stress at 100% elongation; E_b - elongation at break; ShH - Shore A hardness;

TABELA 2. Cytotoksyczność otrzymanych poliuretanów.

TABLE 2. Cytotoxicity of the obtained polyurethanes.

Stężenie Concentration (mg ml ⁻¹)	Spirotox (24 h)		Microtox (15 min)		Protoxkit F (24 h)	
	0.5	1	0.5	1	0.5	1
Bio-PU-1	NT	NT	5	11	NT	NT
Bio-PU-2	NT	NT	3	7	NT	NT
Bio-PU-3	NT	NT	NT	NT	NT	NT
Bio-PU-4	NT	NT	11	17	NT	NT

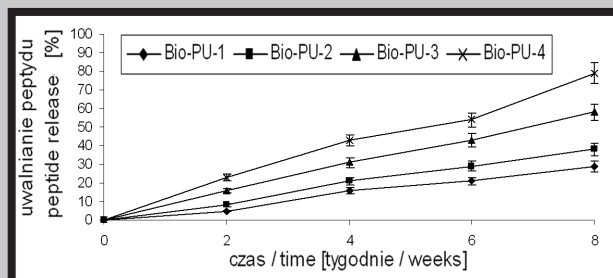
Próbka jest nietoksyczna, jeżeli procent efektu toksycznego jest wyższy niż 20, NT – nie toksyczna; The sample is toxic when the percent of a toxicity effect is higher than 20; NT - not toxic;

Dokonano oceny cytotoksyczności otrzymanych Bio-PU. Jako biosensory zastosowano bakterie luminescencyjne *V. fischeri* oraz dwa pierwotniaki z grupy orzęsków *S. ambigua* i *T. termophila* [14]. Okazało się, że wszystkie badane biomateriały są nietoksyczne (TABELA 2).

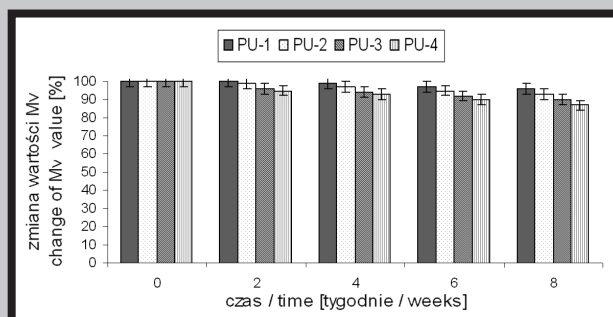
Jak już wspomniano, CT została zaincorporowana w porach otrzymanych matryc PU. Zawartość CT w nośnikach PU wynosiła około 3% wagowych. W dalszej części pracy, przeprowadzono testy uwalniania CT z otrzymanych Bio-PU w warunkach *in vitro*, w buforze PBS, w temp. 37°C, w czasie 8 tygodni. Na RYS. 1 przedstawiono profile uwalniania CT z badanych biomateriałów. Stwierdzono, że rodzaj i wartość M_v zastosowanego w syntezie PU polioliu ma wpływ na uwalnianie CT z otrzymanych nośników. Ilość uwolnionej CT, po 8 tygodniach inkubacji, wynosiła około 29% dla Bio-PU-1 oraz 38% dla Bio-PU-2. Dla porównania, po 8 tygodniach inkubacji, ilość uwolnionej CT wynosiła około 58% dla Bio-PU-3 oraz 79% dla Bio-PU-4. Zaobserwowano, że CT uwalnia się z otrzymanych matryc według kinetyki zbliżonej do kinetyki zerowego-rzędu. Jest to bardzo interesujący wynik, biorąc pod uwagę fakt, że stałe uwalnianie substancji aktywnej jest korzystne z farmakologicznego punktu widzenia i zmniejsza zjawisko wahań stężenia uwolnionego peptydu. Uwalnianie peptydu odbywa się prawdopodobnie według mechanizmu mieszanego (erozji i dyfuzji). Szczegółowa dyskusja na temat modelu kinetycznego uwalniania peptydu będzie możliwa po zakończeniu wszystkich prowadzonych przez nas badań. Jak powszechnie wiadomo, proces degradacji zależy również od porowatości matryc i procentowego udziału porów otwartych. Ich struktura i rozkład mogą także mieć istotny wpływ na dyfuzję uwalnianego peptydu.

Stopień degradacji nośników CT (w warunkach *in vitro*) był oceniany poprzez zmiany M_v PU i ubytek masy (WL) Bio-PU (RYS. 2 i 3). Testy degradacji PU i Bio-PU oraz badania kinetyki uwalniania CT z poszczególnych nośników prowadzono w tych samych warunkach. Stwierdzono, że spadek wartości M_v dla otrzymanych PU wynosił od 4 do 13% po 8 tygodniach degradacji. Odnotowano, że PU-3 i PU-4 degradują szybciej w porównaniu do PU-1 i PU-2. Spadek wartości M_v wynosił 4% dla PU-1, 7% dla PU-2, 10% dla PU-3 oraz 13% dla PU-4. Ponadto, wartość WL dla Bio-PU-3 i Bio-PU-4 wynosiła odpowiednio 11 i 15% po 8 tygodniach procesu degradacji. Z kolei, dla Bio-PU-1 i Bio-PU-2 wartość WL wynosiła odpowiednio 4 i 7% (po 8 tygodniach procesu degradacji).

Podsumowując, można stwierdzić, że wyniki kinetyki uwalniania CT dobrze korelują ze spadkiem wartości M_v poszczególnych PU oraz ubytkiem masy (WL) odpowiednich Bio-PU.

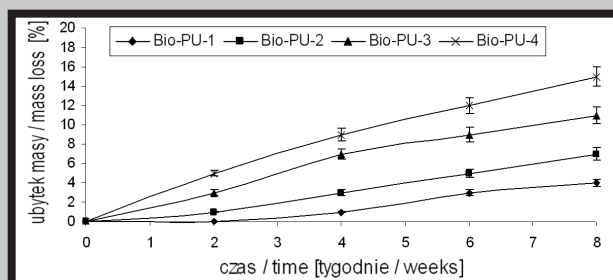


RYS. 1. Profile uwalniania CT z otrzymanych Bio-PU.
FIG. 1. Release of CT from obtained Bio-PU.



RYS. 2. Zmiana wartości M_v PU podczas procesu biodegradacji.

FIG. 2. Change of M_v of PU during biodegradation process.



RYS. 3. Ubytek masy Bio-PU podczas procesu biodegradacji.

FIG. 3. Mass loss of Bio-PU during biodegradation process.

However, detailed discussion of CT release model will be able after finished all our studies. As commonly known, the degradation process also depend on the porosity of matrices and on the contribution of the open pores. Pore structure and connectivity may also have a profound effect on release by diffusion.

In vitro degradation of the obtained Bio-PU was controlled by the change of M_v of PU and mass loss (WL) of Bio-PU (FIGs. 2 and 3). The degradation tests of the obtained PU or Bio-PU and the kinetic rates of CT released from carriers were conducted under the same conditions. The decrease of M_v for the obtained PU was about 4-13% after 8 weeks. It was found that PU-3 and PU-4 were degraded faster in comparison to PU-1 and PU-2. The decrease of M_v was 4% for PU-1, 7% for PU-2, 10% for PU-3 and 13% for PU-4. Moreover, the WL values of Bio-PU-3 and Bio-PU-4 were 11 and 15% after 8 weeks of degradation, respectively. However, for Bio-PU-1 and Bio-PU-2 the WL was 4 and 7% (after 8 weeks).

The results directly comparing CT release with change of the M_v of PU or mass loss (WL) of Bio-PU studies follow the same trend.

Wnioski

Otrzymano nowe biodegradowalne porowate poliuretany nośniki (Bio-PU) citropiny (CT) stosując diole poli(ϵ -kapolaktonu), polilaktydu, poli(adypinianu etylenu) oraz 1,6-diizocyjanian heksametylenu i butano-1,4-diol. Stwierdzono, że szybkość uwalniania CT z Bio-PU zależy głównie od rodzaju polioliu zastosowanego w syntezie poliuretanu (PU). Kluczową rolę odgrywa tu prawdopodobnie szybkość degradacji segmentów giętkich PU. Otrzymane Bio-PU stanowią interesujące materiały dla systemów kontrolowanego uwalniania CT.

Podziękowania

Praca powstała w ramach projektu badawczo rozwojowego pt: "Zastosowanie efektywnych biocydów, w tym peptydów przeciwdrobnoustrojowych, jako biobójczych komponentów tworzyw i materiałów powłokowych w celu polepszenia właściwości środków ochrony przed skażeniami" (Nr OR 0000 25 12), finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego.

Składamy serdeczne podziękowania Panu Prof. Wojciechowi Kamyszowi (Gdański Uniwersytet Medyczny) za syntezę citropiny, prof. Grzegorzowi Nałęcz-Jaweckiemu (Warszawski Uniwersytet Medyczny) za testy cytotoksyczności oraz Pani Violetcie Kowalskiej (Warszawski Uniwersytet Medyczny) za pomiary spektroskopowe.

Conclusions

New biodegradable porous polyurethane carriers (Bio-PU) of citropin (CT) were successfully prepared with poly(ϵ -caprolactone), polylactide or poly(ethylene adipate) diols, 1,6-hexamethylene diisocyanate and butanediol. The release rates of the CT from Bio-PU were shown to be directly dependent on the nature of polyol used in the synthesis of polyurethane (PU). Degradation rate of soft segment PU may play a main role. The obtained Bio-PU are interesting materials for the controlled release of CT.

Acknowledgments

Funding: This work was funded by the Ministry of Science and Higher Education in Poland (Project number OR 0000 25 12 "Application of effective biocides including antimicrobial peptides, an antimicrobial components at polymers and coating materials for improving them against contamination").

We would like to thank Prof. Wojciech Kamysz (from Medical University of Gdansk) for synthesis of citropin, Prof. Grzegorz Nałęcz-Jawecki (from Medical University of Warsaw) for cytotoxic measurements and Violetta Kowalska (from Medical University of Warsaw) for the spectroscopy measurements.

Piśmiennictwo

- [1] Sobczak M., Dębek C., Ołędzka E., Kozłowski R.: Polymeric Systems of Antimicrobial Peptides-Strategies and Potential Applications. *Molecules* 18 (2013) 14122-14137.
- [2] Chen C.Z., Cooper S.L.: Recent advances in antimicrobial dendrimers. *Advanced Materials* 12 (2000) 843-846.
- [3] Kenawy E.R., Worley S.D., Broughton R.: The chemistry and applications of antimicrobial polymers: A state-of-the-art review. *Biomacromolecules* 8 (2007) 1359-1384.
- [4] Palermo E.F., Kuroda K.: Structural determinants of antimicrobial activity in polymers which mimic host defense peptides. *Applied Microbiology and Biotechnology* 87 (2010) 1605-1615.
- [5] Munoz-Bonilla A., Fernandez-Garcia M.: Polymeric materials with antimicrobial activity. *Progress in Polymer Science* 37 (2012) 281-339.
- [6] Liu Q., Jiang L., Shi R., Zhang L.: Synthesis, preparation, in vitro degradation, and application of novel degradable bioelastomers - A review. *Progress in Polymer Science* 37 (2012) 715-765.
- [7] Son J.S., Lee S.H., Lee B., Kim H.J., Ko J.H., Park Y.H., Chun H.J., Kim C.H., Kim J.H., Kim M.S.: Polyurethanes for biomedical application. *Tissue Engineering & Regenerative Medicine* 6 (2009) 427-431.
- [8] Santerre J.P., Woodhouse K., Laroche G., Labow R.S.: Understanding the biodegradation of polyurethanes: from classical implants to tissue engineering materials. *Biomaterials* 26 (2005) 7457-7470.
- [9] Labet M., Thielemans W.: Synthesis of polycaprolactone: A review. *Chemical Society Reviews* 38 (2009) 3484-3504.

References

- [10] Albertsson A.C., Varma I.K.: Recent developments in ring opening polymerization of lactones for biomedical applications. *Biomacromolecules* 4 (2003) 1466-1486.
- [11] Sikorska E., Greber K., Rodziewicz-Motowidło S., Szulika L., Łukasiak J., Kamysz W.: Synthesis and antimicrobial activity of truncated fragments and analogs of citropin 1.1: The solution structure of the SDS micelle-bound citropin-like peptides. *Journal of Structural Biology* 168(2) (2009) 250-258.
- [12] Fields G.B., Noble R.L.: Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics* 35 (1990) 161-214.
- [13] Gorna K., Gogolewski S.: In vitro degradation of novel medical biodegradable aliphatic polyurethanes based on ϵ -caprolactone and Pluronic1 with various hydrophilicities. *Polymer Degradation and Stability* 75 (2002) 113-122.
- [14] Sobczak M., Nałęcz-Jawecki G., Kołodziejki W.L., Gos P., Żółtowska K.: Synthesis and study of controlled release of ofloxacin from polyester conjugates. *International Journal of Pharmaceutics* 402 (2010) 37-43.
- [15] Kuran W., Sobczak M., Listoś T., Dębek C., Florjanczyk Z.: New route to oligocarbonate diols suitable for the synthesis of polyurethane elastomers. *Polymer* 41 (2000) 8531-8541.
- [16] Asefnejad A., Khorasani M.T., Behnamghader A., Farsadzadeh B., Bonakdar S.: Manufacturing of biodegradable polyurethane scaffolds based on polycaprolactone using a phase separation method: physical properties and in vitro assay. *Journal of Nanomedicine* 6 (2011) 2375-2384.