

110. RADIACYJNA STERYLIZACJA POLI(ϵ -KAPROLAKTONU) (I)

KATARZYNA FILIPCZAK*, MAGDALENA WOŹNIAK*, LASZLO OLAH**, PIOTR ULAŃSKI*, JANUSZ M. ROSIAK*, RADOŚLAW M. OLKOWSKI***, MAŁGORZATA LEWANDOWSKA-SZUMIEŁ***

*MIĘDZYRESORTOWY INSTYTUT TECHNIKI RADIACYJNEJ, POLITECHNIKA ŁÓDZKA, UL. WRÓBLEWSKIEGO 15, 93-590 ŁÓDŹ

**DEPARTMENT OF POLYMER ENGINEERING, BUDAPEST UNIVERSITY OF TECHNOLOGY AND ECONOMICS, MUEGYETEM RKP. 3, H-1111 BUDAPEST, HUNGARY

***ZAKŁAD BIOFIZYKI I FIZJOLOGII CZŁOWIEKA,

AKADEMIA MEDYCZNA W WARSZAWIE, UL. CHAŁUBIŃSKIEGO 5, 02-004 WARSZAWA

[*Inżynieria Biomateriałów, 47-53,(2005),110-112*]

Wstęp

Poli(ϵ -kaprolakton) (PCL) jest badany pod kątem przydatności do wytwarzania biodegradowalnych, porowatych struktur do zastosowania w inżynierii tkankowej, np. do odbudowy tkanki kostnej [1,2]. Z uwagi na niską odporność termiczną (temperatura topnienia 55-60°C), a także konieczność sterylizacji przestrzennych, porowatych kształtek, optymalną metodą sterylizacji PCL wydaje się zastosowanie promieniowania jonizującego. Aby skutecznie, racjonalnie modyfikować i sterylizować biomateriały zawierające PCL za pomocą techniki radiacyjnej, niezbędne jest poznanie mechanizmu przemian, jakim ulega ten polimer pod wpływem promieniowania. Celem tej pracy było stwierdzenie, czy dominującym skutkiem napromienienia PCL jest degradacja, czy sieciowanie prowadzące do wzrostu średniego ciężaru cząsteczkowego, zbadanie wpływu napromienienia na wytrzymałość mechaniczną polimeru oraz przeprowadzenie wstępnych testów biogodności napromienionego PCL.

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 w temperaturze pokojowej, z dostępem powietrza lub szczelnie zamknięte po uprzednim usunięciu powietrza poprzez przedmuchiwanie stopionego PCL argonem. Wagowo średnie ciężary cząsteczkowe oznaczano metodą statycznego rozpraszania światła laserowego (Brookhaven Instruments, BI-200SM). Frakcję żelową mierzono grawimetrycznie po uprzednim usunięciu frakcji żolowej poprzez ekstrakcję tetrahydrofuranem. Pomiar wytrzymałościowy wykonano za pomocą urządzenia Instron 5566. We wstępnych badaniach biologicznych próbki polimeru podano sterylizacji dwiema metodami: radiacyjną (poprzez napromienienie dawką 25 kGy) oraz poprzez zanurzenie na 2 h w 10% roztworze antybiotyku-antymikotyku (Gibco, 1000 u/ml penicillin G sodium, 1000 μ g/ml streptomycin sulphate, 2,5 μ g/ml amphotericin B). Następnie badano żywotność ludzkich osteoblastów w kontakcie z PCL sterylizowanym obiema metodami. Komórki hodowano przez 7 dni, a ich przeżywalność badano za pomocą testu XTT [3].

Wyniki

Zmiany wagowo średnich ciężarów cząsteczkowych PCL w funkcji zaabsorbowanej dawki promieniowania jonizują-

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

KATARZYNA FILIPCZAK*, MAGDALENA WOŹNIAK*, LASZLO OLAH**, PIOTR ULAŃSKI*, JANUSZ M. ROSIAK*, RADOŚLAW M. OLKOWSKI***, MAŁGORZATA LEWANDOWSKA-SZUMIEŁ***

*INSTITUTE OF APPLIED RADIATION CHEMISTRY, TECHNICAL UNIVERSITY OF ŁÓDŹ, WRÓBLEWSKIEGO 15, 93-590 ŁÓDŹ, POLAND

**DEPARTMENT OF POLYMER ENGINEERING, BUDAPEST UNIVERSITY OF TECHNOLOGY AND ECONOMICS, MUEGYETEM RKP. 3, H-1111 BUDAPEST, HUNGARY

*** DEPARTMENT OF BIOPHYSICS AND HUMAN PHYSIOLOGY, MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW, CHAŁUBIŃSKIEGO 5, 02-004 WARSZAW, POLAND

[*Engineering of Biomaterials, 47-53,(2005),110-112*]

Introduction

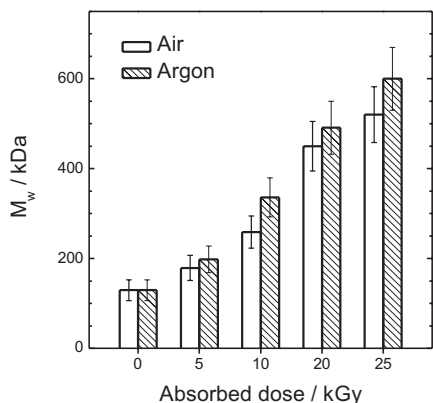
Poly(ϵ -caprolactone) is being tested as a substrate for manufacturing biodegradable, porous structures (scaffolds) to be used in tissue engineering, e.g. for bone tissue regeneration [1,2]. Due to the low thermal resistance of PCL (melting temperature of 55-60°C) and because of the necessity of sterilizing three-dimensional, porous structures, application of ionizing radiation seems to be method of choice for sterilization of such scaffolds. Efficient and rational application of radiation technique in sterilization and modification of PCL-based biomaterials requires the mechanism of radiation-induced transformations in this polymer to be known in some detail. The aim of our work was to find out whether irradiation of PCL leads mainly to degradation or to cross-linking resulting in an increase in average molecular weight and to follow the influence of irradiation on the mechanical strength of the polymer. We also planned preliminary tests to assess the influence of irradiation on PCL biocompatibility.

Materials and methods

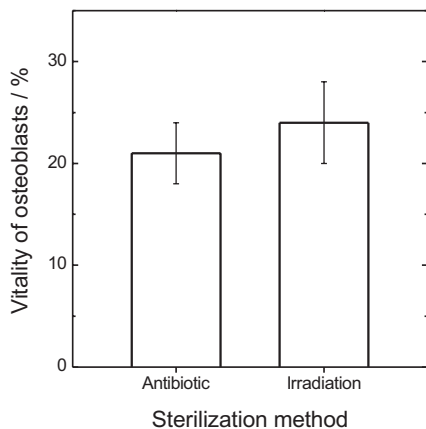
Poly(ϵ -caprolactone) (Aldrich, nominal $M_w = 80$ kDa), was purified by precipitation with water from acetone solution. Samples were subjected to ionizing radiation in the solid state at R.T., with free access of air or in gas-tight vessels after purging with argon in the molten state and subsequent cooling. Weight-average molecular weights were measured by static laser light scattering (Brookhaven Instruments, BI-200SM). Gel fractions were determined gravimetrically after removing the sol fraction by extraction with tetrahydrofurane. Mechanical properties were measured with an Instron 5566 machine. In preliminary biological tests, PCL samples were sterilized by two methods: irradiation with a dose of 25 kGy or immersion for 2 h in 10% solution of an antibiotic-antimycotic (Gibco, 1000 u/ml penicillin G sodium, 1000 μ g/ml streptomycin sulphate, 2,5 μ g/ml amphotericin B). Subsequently, vitality of human osteoblasts in contact with PCL samples sterilized by each method has been assessed. The cells were cultured for 7 days and the vitality was determined by XTT test [3].

Results

Changes in weight-average molecular weight of PCL as a function of absorbed dose are shown in FIG.1, while FIG.2



RYS. 1. Zmiany wagowo średniego ciężaru cząsteczkowego PCL w funkcji dawki zaabsorbowanego promieniowania jonizującego, dla próbek napromienianych w obecności i w nieobecności powietrza.
FIG. 1. Changes in weight-average molecular weight of PCL as a function of absorbed dose of ionizing radiation, for samples irradiated in the presence and absence of air.



RYS. 3. Żywotność osteoblastów w kontakcie z PCL sterylizowanym dwiema metodami, oceniana za pomocą testu XTT względem wzorcowej powierzchni polistyrenowej (TCPS).
FIG. 3. Vitality of osteoblasts in contact with PCL sterilized by two methods, determined by XTT test in relation to a standard polystyrene surface (TCPS).

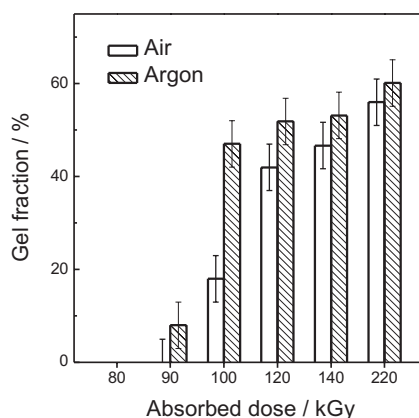
czego są pokazane na RYS.1, natomiast RYS.2 przedstawia powstawanie frakcji usieciowanej (żelowej) przy wysokich dawkach promieniowania.

W TABELI 1 przedstawiono zmiany wytrzymałości PCL na ściskanie wywołane napromienieniem.

RYS.3 ilustruje przeżywalność osteoblastów w kontakcie z PCL sterylizowanym dwiema metodami: radiacyjną i z użyciem antybiotyku.

Dyskusja

Pomiary zmian wagowo średnich ciężarów cząsteczkowych PCL wskazują, że wartości tego parametru rosną wraz z zaabsorbowaną dawką promieniowania, a zatem dominującym procesem towarzyszącym napromienianiu PCL jest



RYS. 2. Udział frakcji żelowej PCL w zależności od zaabsorbowanej dawki promieniowania jonizującego, dla próbek napromienianych w obecności i w nieobecności powietrza.
FIG. 2. Gel fraction of PCL as a function of absorbed dose of ionizing radiation, for samples irradiated in the presence and absence of air.

DAWKĄ ABSORBED DOSE	MODUŁ ELASTYCZNOŚCI (test na ściskanie) COMPRESSIVE ELASTIC MODULUS MPa
kGy	
0	156
20	170
280	191

TABELA 1. Wartości modułu Younga dla nienapromienionych i napromienionych litych próbek PCL (napromienianie w obecności powietrza).
TABLE 1. Values of Young's modulus in compression tests on non-irradiated and irradiated solid PCL samples (irradiation was performed in the presence of air).

illustrates the formation of gel (cross-linked) fraction at high doses.

Changes in compression strength of PCL caused by irradiation are shown in TABLE 1.

FIG.3 illustrates the vitality of osteoblasts in contact with PCL sterilized by two methods: irradiation and treatment with an antibiotic.

Discussion

The values of weight-average molecular weight of PCL increase with absorbed dose. This indicates that cross-linking is the dominating process induced by irradiation. Efficiency of this process is somewhat higher when the polymer is irradiated in the absence of air, since the presence of oxygen promotes competing degradation reactions. Irradiation of PCL with high doses leads to the formation of insoluble, cross-linked (gel) fraction. Gel formation is more efficient for irradiation in the absence of air. This is expressed by a lower gelation dose (88 kGy compared to 94 kGy for samples irradiated in the presence of oxygen) and higher gel fractions at equal absorbed doses. Even at the highest

sieciowanie. Efektywność tego procesu jest nieco wyższa, jeśli polimer jest napromieniany bez dostępu powietrza, ponieważ obecność tlenu sprzyja występowaniu konkurencyjnych względem sieciowania reakcji degradacji. Napromienienie PCL wysokimi dawkami prowadzi do utworzenia frakcji usieciowanej (żelowej). Tworzenie żelu jest nieco bardziej efektywne przy napromienianiu bez dostępu powietrza, co przejawia się niższą wartością dawki żelowania (88 kGy wobec 94 kGy dla próbek napromienianych w obecności tlenu) oraz wyższą zawartością frakcji żelowej przy pochłonięciu jednakowych dawek. Nawet przy najwyższych zastosowanych dawkach udział frakcji żelowej nie przekracza 60%, a zatem w układzie pozostaje znaczna liczba łańcuchów nie związanych w sieć. Można to interpretować jako wynik jednoczesnego zachodzenia reakcji sieciowania i degradacji w badanym układzie oraz znacznego udziału w stałym PCL frakcji krystalicznej, w obrębie której sieciowanie jest mniej efektywne niż we frakcji amorficznej.

Ważnym praktycznym skutkiem przewagi procesów sieciowania nad degradacją podczas napromieniania PCL jest fakt, że nie następuje pogorszenie właściwości mechanicznych materiału, często obserwowane dla wielu innych polimerów i ograniczające możliwość ich radiacyjnej sterylizacji. Zgodnie z oczekiwaniami, wskutek sieciowania obserwuje się nawet pewien wzrost wytrzymałości w funkcji zaabsorbowanej dawki promieniowania. Należy zaznaczyć, że opisane tu pomiary wytrzymałościowe wykonano bezpośrednio po napromienieniu próbek. Wskutek efektu następczego, którego istnienie sygnalizujemy w kolejnym artykule, właściwości napromienionych próbek mogą ulegać pewnym zmianom w czasie ich przechowywania.

Wstępne badania mające na celu ocenę wpływu sterylizacji radiacyjnej na biogodność PCL wykazały, że przeżywalność osteoblastów w kontakcie z PCL sterylizowanym obiema metodami, radiacyjną i z użyciem antybiotyku, jest porównywalna. Jeśli założyć, że kontakt PCL z roztworem antybiotyku nie wpływa w znaczący sposób na chemiczną i fizyczną budowę polimeru, czyli że próbka sterylizowana tą metodą może być utożsamiana z wyjściowym PCL, wyniki przeprowadzonego wstępnego testu wskazują, że sterylizacja radiacyjna nie prowadzi do istotnego pogorszenia biogodności.

Wnioski

Dominującym skutkiem napromieniania poli(ϵ -kapolaktonu) jest sieciowanie międzycząsteczkowe prowadzące do wzrostu średniego ciężaru cząsteczkowego, a przy odpowiednio dużych dawkach do utworzenia przestrzennej sieci łańcuchów połączonych ze sobą wiązaniami kowalencyjnymi (żel). W wyniku tych procesów, napromienianie powoduje wzrost wytrzymałości mechanicznej PCL. Sterylizacja radiacyjna nie prowadzi do istotnego pogorszenia biogodności PCL.

Podziękowania

Praca finansowana przez Ministra Nauki i Informatyzacji w ramach projektu 05/PBZ-KBN-082/T08/2002. L.O. dziękuje Komisji Europejskiej za stypendium w ramach projektu Marie Curie Training Site "Polymeric Biomaterials" (HPMT-CT-2001-00228).

doses applied, the gel fraction does not exceed 60%, thus there is a considerable fraction of unbound, single polymer chains left in the system. This can be explained as a result of cross-linking and degradation reactions taking place side-by-side. A factor that may also contribute is a high fraction of crystalline phase in solid PCL, where the cross-linking is expected to be much less efficient than in the amorphous phase.

An important result of the dominance of cross-linking over chain scission during irradiation of PCL is the lack of deterioration in mechanical properties. The latter effect is frequently encountered for other polymers, being a serious obstacle to their radiation sterilization. As expected, in the case of PCL there is even some increase in mechanical strength with increasing dose. One should mention that the mechanical tests described here were performed directly after irradiation. As a result of post-effect, described in more detail in the following paper, the properties of irradiated PCL samples may undergo some changes during long-term storage.

Initial tests aimed at assessment of the irradiation influence on biocompatibility of PCL indicate that vitality of osteoblasts in contact with PCL sterilized by both methods, irradiation and antibiotics, is comparable. If we assume that the contact with antibiotics in solution has no marked influence on the chemical and physical structure of the polymer (i.e. that the sample sterilized with antibiotics is equivalent to non-irradiated PCL), the obtained results show no significant decrease in biocompatibility due to radiation sterilization.

Conclusions

The main effect of irradiation on poly(ϵ -caprolactone) is intermolecular cross-linking leading to an increase in average molecular weight and, at sufficiently high doses, to the formation of three-dimensional network of covalently bound chains (gel). As a result, an increase in mechanical strength of PCL is observed.

Radiation sterilization does not lead to significant decrease in biocompatibility of PCL.

Acknowledgements

This work was financed by the Minister of Science and Information Society Technologies, Poland (project 05/PBZ-KBN-082/T08/2002). L.O. thanks the European Commission for a stipend in the framework of Marie Curie Training Site "Polymeric Biomaterials" (HPMT-CT-2001-00228).

Piśmiennictwo

- [1] Corden T.J.; Jones I.A., Rudd C.D., Christian P., Downes S., McDougall K.E.: Physical and Biocompatibility Properties of Poly- ϵ -Caprolactone Produced Using In Situ Polymerisation: A Novel Manufacturing Technique for Long-Fibre Composite Materials, *Biomaterials* 21, (2000), 713-724.
- [2] Kweon H., Yoo M.K., Park I.K., Kim T.H., Lee H.Ch., Lee H.-S., Oh J.-S., Akaike T., Cho Ch.-S.: A Novel Degradable Polycaprolactone Networks for Tissue Engineering, *Biomaterials* 24, (2003), 801-808.
- [3] Scudiero D.A., Shoemaker R.H., Paull K.D. Tierney S.: Evaluation of a Soluble Tetrazolium / Formazan Assay for Cell Growth and Drug Sensitivity in Culture Using Human and Other Tumor Cell Lines, *Cancer Res.* 48, (1988), 4827-4833.

References